

**Heterologe Produktion und rationales Design neuer
Peptidantibiotika in *Bacillus subtilis***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Katrin Eppelmann

aus Wilhelmshaven

Marburg/Lahn 2002

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 16.09.2002 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel
Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars O. Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2002

Die Neugier
steht immer an erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will.

Galileo Galilei

Teile dieser Arbeit wurden bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht und sind unter folgenden Literaturstellen zu finden:

Eppelmann, K., Doekel, S. & Marahiel, M. A. (2001). Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **276**, 34824-34831.

Eppelmann, K., Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A. (2002). Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry* **41**, 9718-9726.

Doekel, S., Eppelmann, K. & Marahiel, M. A. (2002). Heterologous expression of nonribosomal peptide synthetases in *B. subtilis*: Construction of a bi-functional *B. subtilis* / *E. coli* shuttle vector system. *FEMS Microbiol. Lett.* **in press**.

Mootz, H. D., Kessler, N., Linne, U., Eppelmann, K., Schwarzer, D. & Marahiel, M. A. (2002). Decreasing the ring-size of a nonribosomal peptide antibiotic by in frame module deletion in the biosynthetic genes. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10980-10981.

Zusammenfassung

Die bislang beschriebenen Methoden zur gerichteten, genetischen Manipulation von nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPSs) sind auf die Fusion und den Austausch von vollständigen Domänen und Module beschränkt. Hierbei kommt es jedoch zu enormen Eingriffen in das nichtribosomale Proteintemplat, so dass Störungen der inter- und intramodularen Kommunikation, sowie der Tertiärstruktur nicht ausgeschlossen werden können. In dieser Arbeit wurde eine neue Methode etabliert, welche zu einer Veränderung der Substrat-Selektivität von NRPSs A-Domänen durch ortsgerichtete Mutagenese führt. Bei dieser Technik, welche auf dem nichtribosomalen Kode von NRPSs basiert, ist der Eingriff in das Proteintemplat auf den Austausch einzelner Aminosäure-Reste innerhalb der Substrat-Bindungstasche limitiert, so dass die genannten Störungen minimiert werden können. Die Anwendung ist nicht nur auf einzelständige A-Domänen beschränkt, sondern kann vielmehr auch für eine Veränderung der Substrat-Selektivität von A-Domänen innerhalb von vollständigen Modulen und Synthetasen *in vitro* und *in vivo* angewendet werden. So konnte gezeigt werden, dass die Änderung eines einzigen Kodons innerhalb des 26kb-umfassenden Surfactin-Biosynthese-Genklusters von *B. subtilis* ausreicht, um den Austausch der konservierten AS L-Asp⁵ gegen das korrespondierende Seitenkettenamid (L-Asn) im neuen Lipoheptapeptid-Derivat [Asn⁵]-Surfactin zu erhalten.

Aufgrund der genetischen Unzugänglichkeit der Produzentenstämme beschränkten sich die *in vivo*-Untersuchungen zur gerichteten Manipulation von NRPSs bislang auf das Surfactin-Biosynthese-System aus *B. subtilis*. Diese Limitation konnte in dieser Arbeit anhand der Etablierung eines heterologen Expressionssystems für NRPSs Gene und vollständige Biosynthese-Genkluster im genetisch zugänglichen Wirt *B. subtilis* gelöst werden. Neben der Produktion der multimodularen NRPSs in ihrer funktionellen und aktiven holo-Form, konnte die Ausbildung des Resistenz-Mechanismus gegen das produzierte Peptidantibiotikum Bacitracin aufgezeigt werden. Durch die Rekonstitution dieses Biosynthese-Systems im genetisch zugänglichen Wirt *B. subtilis*, steht nun ein weiteres NRP-Biosynthese-System für die gerichtete Manipulation des nichtribosomalen Proteintemplates zum rationalen Design neuer Peptidantibiotika zur Verfügung.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung	5
2.1	Die Ausbreitung von Antibiotika-Resistenzen	5
2.2	Naturstoffe in der Wirkstoffentwicklung	6
2.3	Nichtribosomale Peptid-Biosynthese	7
2.4	Das Peptidantibiotikum Bacitracin	12
2.4.1	Die Bacitracin-Biosynthese	14
2.5	Das Lipoheptapeptid Surfactin	17
2.5.1	Die Biosynthese des Lipoheptapeptides Surfactin	18
2.6	Gerichtete Manipulation von NRPSs zum rationalen Design neuer Peptidantibiotika	19
2.6.1	Konstruktion von artifiziellen Hybridsynthetasen mittels Modulfusion	20
2.6.2	Einführung und Deletion von optionalen Domänen in nichtribosomalen Proteintemplaten	22
2.6.3	Abspaltung von verkürzten Peptiden durch die Translokation der Thioesterase-(Te)-Domäne	23
2.6.4	Austausch und Deletion von Modulen innerhalb eines vollständigen NRP-Biosynthese-Systems	24
2.7	Veränderung der Substrat-Selektivität von Adenylierungs-(A)-Domänen	26
2.7.1	Die Kristallstruktur der Phenylalanin-selektiven A-Domäne PheA	27
2.7.2	Der Selektivitäts-vermittelnde Kode der NRPS A-Domänen	29
2.8	Heterologe Expression von NRPS-Genen	31
2.8.1	Heterologe Produktion von rekombinanten Proteinen	32
2.8.2	Posttranslationale Modifikation von NRPSs	33
2.8.3	Rekonstitution der NRP-Biosynthese in einem heterologen Wirt	34
2.9	Aufgabenstellung	36

3	Material	37
3.1	Verwendete Mikroorganismen	37
3.2	Plasmide	38
3.2.1	pQE60/pQE70	38
3.2.2	pAspA(H322E)	38
3.2.3	pREP4	38
3.2.4	pBluescriptII SK(-)	39
3.2.5	pKE18/pKE19	39
3.2.6	p Δ TE	39
3.2.7	pDG646/pDG783	40
3.2.8	pNEXT33A	40
3.2.9	pCm::Tc	41
3.3	Medien	41
3.4	Chemikalien und Laborprodukte	42
3.5	Geräte	44
4	Methoden	46
4.1	Molekularbiologische Methoden	46
4.1.1	Plasmid-Konstruktion	46
4.1.2	DNA-Sequenzierung	52
4.1.3	Transformation von <i>B. subtilis</i>	52
4.1.4	Southern-Blot-Analyse	54
4.2	Proteinchemische Methoden	54
4.2.1	Genexpression unter der Kontrolle des T5-Promotors	54
4.2.2	Genexpression unter der Kontrolle des σ^A -abhängigen <i>bacA</i> -Promotors	55
4.2.3	Aufschluss von <i>E. coli</i> Zellen	55
4.2.4	Aufschluss von <i>B. subtilis</i> Zellen	55
4.2.5	Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie	55
4.2.6	Reinigung von C _{srfA-A1} -(A _{Asp} -PCP-C-A _{Leu} -PCP) _{srfA-B2-3} aus <i>B. subtilis</i> SD10	56
4.2.7	Reinigung von BacA aus <i>B. subtilis</i> KE320	57
4.2.8	ATP/Pyrophosphat-Austauschreaktionen	58

4.2.9	Beladung von NRPSs mit radioaktiv-markierten Aminosäuren	60
4.2.10	Posttranslationale Modifikation <i>in vitro</i>	61
4.3	Analytische Methoden	62
4.3.1	Surfactin-Präparation	62
4.3.2	Surfactin-Analyse unter Verwendung von Blutagarplatten	63
4.3.3	Surfactin-Analyse mittels HPLC/MS	64
4.3.4	Surfactin-Analyse mittels fragmentierender Massenspektrometrie (ESI-MS/MS)	64
4.3.5	Bacitracin-Präparation	65
4.3.6	Mikrobiologische Bacitracin-Analyse	66
4.3.7	Bacitracin-Analyse mittels HPLC/MS	67
5	Ergebnisse I: Gezielte Veränderung der Substrat-Selektivität von Adenylierungs-(A)-Domänen durch ortsgerichtete Mutagenese	68
5.1	Strategie	68
5.2	Veränderung der Substrat-Selektivität der einzelständigen A-Domäne AspA (SrfA-B2)	69
5.2.1	Konstruktion und Überproduktion von AspA*	70
5.2.2	Substrat-Selektivität von AspA*	71
5.2.3	Katalytische Effizienz von AspA*	72
5.3	Veränderung der Substrat-Selektivität von C-A _{Glu} -PCP (SrfA-A1)	73
5.3.1	Konstruktion und heterologe Produktion von C-A _{Glu} *-PCP	74
5.3.2	Katalytische Effizienz von C-A _{Glu} *-PCP	76
5.4	Manipulation des Surfactin-Biosynthese-Genclusters	76
5.4.1	Veränderung der Substrat-Selektivität von SrfA-B2	77
5.4.2	Isolierung und Charakterisierung von [Asn ⁵]-Surfactin aus <i>B. subtilis</i> KE100	79
5.4.3	Veränderung der Substrat-Selektivität von SrfA-A1	83
6	Ergebnisse II: Heterologe Expression einer artifiziellen, dimodularen Peptidsynthetase in <i>B. subtilis</i> KE30	86
6.1	Strategie	86

6.2	Der heterologe Wirt <i>B. subtilis</i> KE30	86
6.3	Konstruktion der <i>E. coli</i> / <i>B. subtilis</i> Expressionsvektoren	87
6.4	Überproduktion der artifiziellen, dimodularen Hybridsynthetase $C_{srfA-A1}-(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)_{srfA-B2-3}(-His_6)$ in <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	90
6.5	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten, dimodularen Peptidsynthetasen	92
7	Ergebnisse III: Heterologe Expression des vollständigen Bacitracin-Biosynthese-Genclusters in <i>B. subtilis</i>	95
7.1	Strategie	95
7.2	Integration des 49kb-umfassenden Bacitracin-Biosynthese-Gen- clusters in die ehemalige <i>srfA</i> -Region von <i>B. subtilis</i>	96
7.2.1	Integration von <i>bacT</i> und <i>bacA</i> in <i>B. subtilis</i> KE30	97
7.2.2	Reinigung und biochemische Charakterisierung von BacA aus <i>B. subtilis</i> KE320	99
7.2.3	Integration von <i>bacB</i> , <i>bacC</i> und <i>bcrABC</i> in <i>B. subtilis</i> KE320	101
7.2.4	Rekonstitution des Zwei-Komponentensystems <i>bacRS</i>	102
7.2.5	Heterologe Produktion des Peptidantibiotikums Bacitracin in <i>B. subtilis</i> KE360	104
7.2.6	Bacitracin-Resistenz in <i>B. subtilis</i> KE360	107
8	Diskussion	108
8.1	Veränderung der Substrat-Selektivität von NRPS A-Domänen <i>in vitro</i>	109
8.1.1	Auswirkungen der Substrat-Veränderung auf die katalytische Effizienz der konstruierten Mutanten	111
8.1.2	Degenerierung des Selektivitäts-vermittelnden Codes für Glutamat- sowie Glutamin-aktivierende A-Domänen	114
8.1.3	Erweiterung des Selektivitäts-vermittelnden Codes	115
8.2	Veränderung der Substrat-Selektivität von NRPS A-Domänen <i>in vivo</i>	118
8.2.1	Veränderung der Substrat-Selektivität an Position 5 des Surfactin-Biosynthese-Systems	120

8.2.2	Veränderung der Substrat-Selektivität an Position 1 des Surfactin-Biosynthese-Systems	121
8.2.3	Sensitivität von <i>B. subtilis</i> ATCC 21332	122
8.2.4	Selektion auf den Verlust eines Marker-Gens in <i>B. subtilis</i>	123
8.3	Veränderung der Substrat-Selektivität – ein Ausblick	125
8.4	Heterologe Expression von NRPS-Genen in <i>B. subtilis</i>	126
8.4.1	Chromosomale Integration in die ehemalige <i>srfA</i> -Region von <i>B. subtilis</i> KE30	126
8.4.2	Überproduktion von NRPSs in <i>B. subtilis</i>	127
8.4.3	Posttranslationale Modifikation in <i>B. subtilis</i>	129
8.4.4	Ausbildung der Bacitracin-Selbst-Resistenz in <i>B. subtilis</i>	131
8.4.5	Quantifizierung der Bacitracin-Produktion im heterologen Wirt <i>B. subtilis</i> KE360	132
8.4.6	Zusammensetzung des produzierten Bacitracin-Komplexes im heterologen Wirt <i>B. subtilis</i>	133
8.4.7	Funktion der NRPSs assoziierten TypII-Thioesterase (TEII)	134
8.5	Heterologe Expression in <i>B. subtilis</i> – ein Ausblick	135
9	Anhang	137
9.1	Konstruierte Stämme und Plasmide	137
9.2	Sequenzalignments und Homologie-Vergleiche	139
9.2.1	Analyse der vollständigen Asp- und Asn-selektiven A-Domänen	139
9.2.2	Analyse der Proteinregion zwischen den Core-Sequenzen A4 und A5 der Asp- und Asn-selektiven A-Domänen	140
9.2.3	Analyse der vollständigen Glu- und Gln-selektiven A-Domänen	142
9.2.4	Analyse der Proteinregion zwischen den Core-Sequenzen A4 und A5 der Glu- und Gln-selektiven A-Domänen	143
9.3	Der erweiterte Selektivitäts-vermittelnde Kode von NRPS A-Domänen	145
9.4	Hochkonservierte Core-Motive der strukturell eigenständigen Domänen von NRPS	150
10	Literaturverzeichnis	152

1 Abkürzungen

A	Adenin
A-Domäne	Adenylierungs-Domäne
ABC	ATP-Bindekassette (<i>ATP binding cassette</i>)
ACP-Domäne	Acyl-Carrier-Protein-Domäne
ACV	δ -(α -Aminoadipyl)-Cysteinyl-D-Valin
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ArCP-Domäne	Aryl-Carrier-Protein-Domäne
AS	Aminosäure
ATCC	Stammsammlung (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
<i>bla</i>	Ampicillin-Resistenz-Kassette (kodierendes Gen der β -Lactamase)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Cytosin
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Resistenz-Kassette (kodierendes Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase)
C-Domäne	Kondensations-Domäne
Cm	Chloramphenicol
CMC	kritische micellare Konzentration (<i>critical micelle concentration</i>)
CoASH	Ko-Enzym A (<i>coenzyme A</i>)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
Cy-Domäne	Heterozyklisierungs-Domäne (<i>cyclization domain</i>)
d	Tag(e)
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
DHB	2,3-Dihydroxy-Benzoat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

dpm	Zerfälle pro Minute (<i>desintegrations per minute</i>)
DTE	1,4-Dithioerythrol
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	Vergrößerte Chemolumineszenz Detektion (<i>enhanced chemiluminescent detection</i>)
E-Domäne	Epimerisierungs-Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylendiamintetraacetat</i>)
<i>erm</i>	MLS-Resistenz-Kassette
ESI	Elektronen-Spray-Ionisierung
FPLC	schnelle Flüssigkeits-Chromatographie (<i>fast performance liquid chromatography</i>)
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde(n)
HEPES	2[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin]-1-Ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IP	C ₅₅ -Isoprenylphosphat
IPP	C ₅₅ -Isoprenylpyrophosphat
IPTG	Isoprenyl-β-D-thiogalaktosid
IU	internationale Einheiten (<i>international units</i>)
k	kilo
<i>kan</i>	Kanamycin-Resistenz-Kassette
kb	Kilobasenpaare
k _{cat}	Maximale Katalysegeschwindigkeit bei Substratsättigung
k _{cat} /K _M	Katalytische Effizienz
K _m	Kanamycin
K _M	Michaelis-Menten Konstante
L	Liter
m	Meter oder <i>milli</i> (10 ⁻³) in Verbindung mit weiteren Maßeinheiten
M	molar (mol/L)
M-Domäne	N-Methylierungs-Domäne
μ	<i>micro</i> (10 ⁻⁶)

MCS	multipler Klonierungsbereich (<i>multiple cloning site</i>)
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MLS	Erythromycin und Lincomycin
MS	Massenspektrometrie
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
n	<i>nano</i> (10^{-9})
<i>neo</i>	Neomycin-Resistenz-Kassette
Nm	Neomycin
NRP	nichtribosomale Peptide
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
NTA	Nitrilotriacetat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
<i>ori</i>	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
p	<i>pico</i> (10^{-12})
Ppant	4'-Phosphopantethein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCP-Domäne	Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
P _n	<i>n</i> -Promotor
PP _i	anorganisches Pyrophosphat (<i>inorganic pyrophosphate</i>)
R	organischer Rest
RBS	ribosomale Bindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SNAC	<i>N</i> -Acetyl-Cysteamin-Thioester (<i>thioesterfied N-acetyl cysteamin</i>)
T	Thymin
Tc	Tetracyclin
TEII	TypII-Thioesterase
Te-Domäne	Thioesterase-Domäne

<i>tet</i>	Tetracyclin-Resistenz-Kassette
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetate</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure (<i>transfer ribonucleic acid</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp

Tab. 1.1: Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Kode	Ein-Buchstaben-Kode	Molekulargewicht (g/mol)
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamat	Glu	E	147
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Ornithin	Orn	-	132
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

2 Einleitung

2.1 Die Ausbreitung von Antibiotika-Resistenzen

In den letzten Jahren wurde von der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) ein dramatischer Anstieg in der Ausbreitung von Infektionskrankheiten beobachtet. So waren 1996 weltweit 33% aller Todesfälle, sowie 17 der zwanzig häufigsten, krankheitsbedingten Todesursachen auf Infektionen zurückzuführen. Erschreckend hierbei ist, dass die größte Gefahr nicht unbedingt von "neuen" Krankheitserregern wie z. B. dem kürzlich entdeckten Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) oder dem Ebola-Virus ausgeht, sondern vielmehr in einer Rückkehr altbekannter, eigentlich als besiegt geglaubter Krankheiten begründet liegt. Als Beispiel hierfür kann Tuberkulose genannt werden, welche von dem pathogenen Organismus *Mycobacterium tuberculosis* verursacht wird, an der jährlich ca. drei Millionen Menschen sterben [Halls, 1999].

Die Ursache für diesen alarmierenden Trend ist in der großen Anpassungsfähigkeit von Bakterien begründet. Aufgrund ihrer enormen Anzahl, geringer Generationszeit, sowie inhärent-hohen Mutationsrate sind die Erreger in der Lage sich einem äußeren Selektions-Druck (z. B. durch ein Antibiotikum) anzupassen [Walsh, 2000]. So kommt es bei der Antibiotika-Behandlung einer bakteriellen Infektion nur noch selten zum Abtöten der gesamten Bakterien-Population, stattdessen sind einzelne Erreger in der Lage Resistenzen gegen das verwendete Antibiotikum auszubilden. Während es zum Absterben der sensitiven Bakterien kommt, überleben diese resistenten Keime und die eigentlich besiegt geglaubte Infektion kann erneut ausbrechen.

Die rasante Ausbreitung von Antibiotika-Resistenzen erfolgt über den horizontalen Transfer von genetischem Material. Die Hauptrolle hierbei spielen Plasmide, welche die Gene zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz tragen [Davies, 1994]. Diese ringförmigen DNAs liegen in den Bakterien als selbst-replizierende Einheiten außerhalb des Chromosoms (also extrachromosomal) vor und können zwischen Bakterien-Zellen - auch über die Grenzen einer Spezies hinaus - ausgetauscht werden. Alternativ kann die Übertragung von Resistenz-Genen auch über "springende Gene", sogenannte Transposons, erfolgen, welche in der Lage sind

sich aktiv aus der DNA herauszuschneiden, um anschließend in eine neue DNA-Region zu integrieren [Arthur & Courvalin, 1993].

Gerade in klinischen Einrichtungen, in denen Bakterien durch die gehäufte Anwendung von Antibiotika ständig einem äußeren Selektionsdruck ausgesetzt sind, stellt die Ausbildung von resistenten Bakterien-Populationen ein enormes Risiko dar. So waren 1946, ca. fünf Jahre nach Einführung des Penicillins, bereits 14% der isolierten *Staphylococcus*-Stämme resistent gegen dieses erste, klinisch-relevante Antibiotikum. Nur drei Jahre später waren es schon 60%, und heute sind nahezu alle *Staphylococcus*-Kulturen aus Krankenhaus-Isolaten Penicillin-resistent [Walsh, 2000]. Die geschilderte Problematik eskaliert in jüngster Zeit sogar noch durch das Auftreten multi-resistenter Organismen. So konnte gezeigt werden, dass bei der Behandlung von Methicillin-sensitiven *Staphylococcus aureus*-Stämmen die Bakterien innerhalb von sieben Tagen in der Lage waren, eine Resistenz gegen das Antibiotikum auszubilden. Erfolgte anschließend die Weiterbehandlung der Infektion mit dem Reserve-Antibiotikum Vancomycin, so konnten bereits nach 14 Tagen erste Vancomycin-resistente *S. aureus*-Populationen nachgewiesen werden [Schentag *et al.*, 1998].

Die genannten Beispiele zeigen drastisch, dass sich bei der Einführung eines neuen Antibiotikums nicht die Frage stellt *ob*, sondern nur *wann* die pathogenen Bakterien in der Lage sind eine Resistenz gegen den neuen Wirkstoff auszubilden [Davies, 1994; Levy, 1998]. Um weiterhin eine effiziente Behandlung von Infektions-erkrankungen zu gewährleisten, stellt die Entdeckung und Entwicklung neuer Antibiotika daher eine ständige und drängende Herausforderung dar.

2.2 Naturstoffe in der Wirkstoffentwicklung

In der pharmazeutischen Chemie werden heutzutage für die Entdeckung von neuen Wirkstoffen große Bibliotheken aus Naturstoffen und synthetischen Molekülen generiert. Bei der empirischen Suche nach einer gewünschten Aktivität innerhalb dieser Bibliotheken konnte gezeigt werden, dass bei den Naturstoffen etwa zehnmals häufiger potentielle Wirkstoffkandidaten entdeckt werden. Demzufolge wird der Klasse der Naturstoffe eine wichtige Rolle bei der Lösung der gerade geschilderten Resistenz-Problematik zugesprochen [Grabley & Thiericke, 1999; Schmid *et al.*, 1999].

Die Entdeckung neuer Naturstoffe wird jedoch durch die problematische Isolierung, sowie die geringe Produktivität der natürlichen Produzentenstämme limitiert. Zur Umgehung dieser Engpässe wird daher versucht durch die Modifikation bekannter Naturstoffe neue Verbindungen mit veränderten oder erhöhten Bioaktivitäten zu generieren. Auf chemischem Weg konnten hierbei einige potente, halbsynthetische Derivate (z. B. β -Lactam-Verbindungen) erzeugt werden, wobei die Veränderungen jedoch auf einzelne funktionelle Gruppen innerhalb des Naturstoffes limitiert waren. Ein breiterer Ansatz zum rationalen Design von neuen Antibiotika stellt hingegen die gerichtete Manipulation der Biosynthese-Wege dar. In diesem Zusammenhang stellt die Gruppe der nichtribosomalen Peptidantibiotika ein geeignetes Ziel für die kombinatorische Biosynthese dar [Cane *et al.*, 1998; Rodriguez & McDaniel, 2001; Walsh, 2002].

2.3 Nichtribosomale Peptid-Biosynthese

Die nichtribosomalen Peptidantibiotika werden von einer Vielzahl von Mikroorganismen wie filamentösen Pilzen, sowie Gram-positiven Bakterien der Spezies *Actinomyces* und - nicht zuletzt – *Bacillus* produziert und besitzen zahlreiche, pharmakologisch-relevante Wirkeigenschaften. Prominenteste Beispiele sind in diesem Zusammenhang vor allem (i) die antibakteriell-wirkenden β -Lactame (z. B. Penicillin) und Cephalosporine, welche sich von dem Tripeptid-Precursor ACV ableiten [Smith *et al.*, 1990a], (ii) das Reserve-Antibiotikum Vancomycin, (iii) das Immunsuppressivum Cyclosporin [Weber *et al.*, 1994], sowie (iv) der Antitumor-Wirkstoff Bleomycin [Du *et al.*, 2000].

Das breite Wirkungsspektrum dieser Sekundärmetabolite kann in erster Linie auf ihre enorme strukturelle Komplexität zurückgeführt werden (Abb. 2.1). So können neben den bekannten 20 proteinogenen Aminosäuren auch an die hundert weitere Substrate wie nichtproteinogene Aminosäuren, Carboxy- und Hydroxysäuren in die Produkte inkorporiert werden. Des weitern treten häufig zusätzliche Modifikationen der Peptidkette dieser Naturstoffe durch N-, C- und O-Methylierung, Acylierung, Glykosilierung, C $_{\alpha}$ -Epimerisierung und Heterozyklisierung auf [Mootz *et al.*, 2002a]. Außerdem kommt es neben linearen Peptiden auch zur Bildung von zyklischen und zyklisch-verzweigten Strukturen (siehe Abb. 2.1).

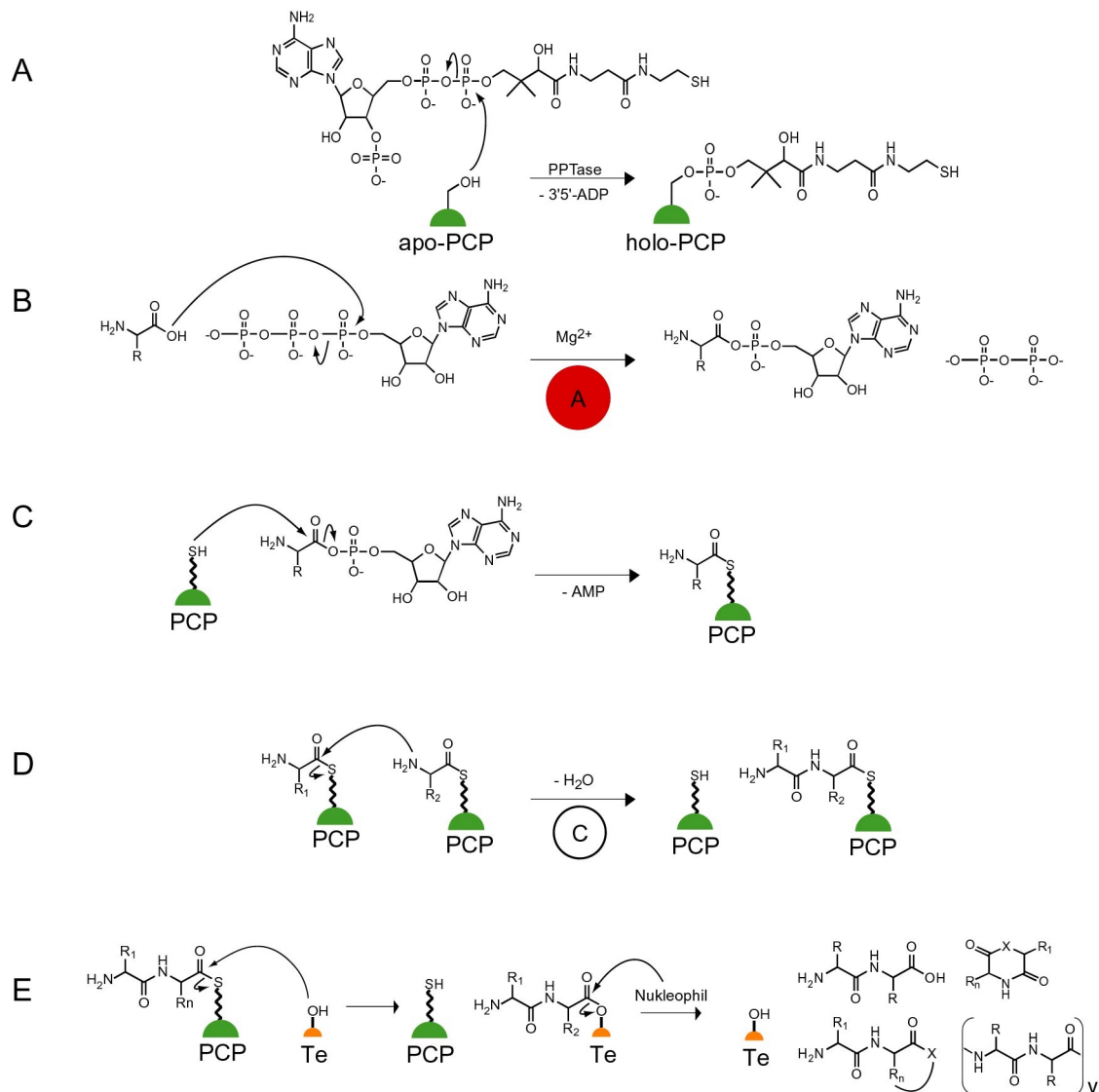


Abb. 2.2: Die fünf essenziellen Reaktionen der nichtribosomalen Peptid-Biosynthese

(A) Die posttranslationale Modifikation der PCP-Domänen (grün) wird durch spezialisierte PPTasen katalysiert. Hierbei kommt es zum nukleophilen Angriff der Hydroxyl-Gruppe des konservierten Serin-Restes der PCP-Domäne auf die β -3'-Phosphatgruppe des CoASH und somit zur kovalenten Bindung des Ko-Faktors Ppant. (B) Die Substrat-Aminosäure wird spezifisch von einer A-Domäne (rot) erkannt, unter ATP-Hydrolyse als Aminoacyl-Adenylat aktiviert und anschließend (C) kovalent als Aminoacyl-S-Ppant Thioester auf der assoziierten PCP-Domäne gebunden. (D) Die C-Domäne (weiß) katalysiert die Bildung der Peptidbindung zwischen zwei, auf benachbarten PCP-Domänen gebundenen Intermediaten. (E) Die Abspaltung des vollständigen Produktes als lineares, zyklisches, zyklisch-verzweigtes oder multimeres Peptid erfolgt unter der Katalyse der Te-Domäne (orange) ($X=N, O$).

Die Substrat-Aminosäuren und Peptid-Intermediate sind bei der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese über den Ko-Faktor 4'-Phosphopantethein (Ppant) kovalent an die einzelnen Modulen gebunden. Dies erfordert die posttranslationale Modifikation der inhärenten Peptidyl-Carrier-Protein-(PCP)-Domänen (oder auch Thiolierungs-(T)-Domänen) und ihre Umwandlung von der inaktiven apo- zur phosphopantetheinylierten, aktiven holo-Form. Dieses *Priming* erfolgt durch spezialisierte Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen), die den nukleophilen

Angriff der Hydroxyl-Gruppe eines konservierten Serin-Restes der PCP-Domäne auf die β -3'-Phosphatgruppe des Ko-Substrates CoASH katalysieren [Lambalot *et al.*, 1996]. Hierbei kommt es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem konservierten Serin-Rest der PCP-Domäne und dem Ko-Faktor Ppant, welcher anschließend für die Substrat-Bindung zur Verfügung steht.

Die spezifische Aktivierung der Substrat-Aminosäure erfolgt unter der katalytischen Kontrolle einer Adenylierungs-(A)-Domäne. Diese ist in der Lage, die kognate Aminosäure spezifisch zu erkennen und unter ATP-Hydrolyse als korrespondierendes Aminoacyl-Adenylat zu aktivieren [Stachelhaus & Marahiel, 1995]. Anschließend erfolgt die Übertragung dieser aktivierten Zwischenstufe auf den Ko-Faktor Ppant der C-terminal assoziierten PCP-Domäne, auf der das Substrat kovalent als Thioester gebunden wird [Stein *et al.*, 1994]. Durch diese Bindung der Aminosäure auf dem Ppant-Arm der PCP-Domäne wird der Transport des aktivierten Substrates zu den katalytischen Untereinheiten des Proteintemplates ermöglicht [Stein *et al.*, 1996]. Die Verknüpfung der als Thioester gebundenen Intermediate erfolgt anschließend unter der katalytischen Kontrolle der Kondensations-(C)-Domänen [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Hierbei dient das N-terminal lokalisierte Aminoacyl-/Peptidyl-S-PCP als Donor des Ko-Substrates, welches vom C-terminal lokalisierten Aminoacyl-S-PCP Akzeptor nukleophil attackiert wird. Bei der Bildung der Peptidbindung kommt es zur Abspaltung von Wasser und der Verlängerung der als Thioester gebundenen Peptidkette auf der stromabwärts lokalisierten PCP-Domäne.

Es konnte gezeigt werden, dass die C-Domäne eine hohe Selektivität für den Aminoacyl-S-PCP Akzeptor besitzt [Belshaw *et al.*, 1999; Ehmann *et al.*, 2000]. Hierdurch soll vermutlich eine Mis-Initiation des Biosynthese-Prozesse verhindert werden, da das Aminoacyl-S-PCP auf diese Weise daran gehindert wird direkt zur stromabwärts-gelegenen C-Domäne fortzuschreiten um dort als Acylgruppen-Donor zu fungieren.

Durch die Wiederholung dieser Schritte der Substrat Erkennung und Aktivierung, sowie die Bildung der Peptidbindung und Translokation des gebildeten Peptides von Modul zu Modul kommt es zur geordneten Bildung des vollständigen Produktes, welches als Peptidyl-Thioester auf dem Ppant Ko-Faktor der letzten PCP-Domäne des Proteintemplates gebunden ist (siehe Abb. 2.3). Die Freisetzung des fertigen Peptides erfolgt anschließend unter der katalytischen Kontrolle der C-terminalen, internen Thioesterase-(Te)-Domäne [Schneider & Marahiel, 1998; Schwarzer *et al.*, 2001]. Hierbei kommt es zunächst zur Übertragung des vollständigen linearen

Peptidyl-Intermediates vom Ko-Faktor Ppant auf die Seitenkette eines hoch-konservierten Serin-Restes der Te-Domäne [Shaw-Reid *et al.*, 1999]. Dieser Rest befindet sich innerhalb der CoreT-Sequenz GxSxG und ist an der Ausbildung der aus Serin-Proteasen und Thioesterasen bekannten katalytischen Triade Asp-His-Ser beteiligt [Li *et al.*, 1996; Pazirandeh *et al.*, 1991; Tai *et al.*, 1993]. In Abhängigkeit des verwendeten Nukleophils und der Substrat-Spezifität der Te-Domäne können bei der anschließenden Hydrolyse des Peptidyl-O-Ser-Esters lineare (\rightarrow Wasser), zyklische (\rightarrow N-terminales Nukleophil), zyklisch-verzweigte (\rightarrow interne, nukleophile Seitengruppe) oder multimere (\rightarrow N-terminales Nukleophil einer weiteren Peptidkette) Peptide erhalten werden.

Anhand der beschriebenen Synthese-Strategie besitzt ein Elongations-Modul, welches eine Aminosäure in die wachsende Peptidkette einbaut, die Domänen-Organization C-A-PCP (siehe Abb. 2.3). Da beim Einbau der ersten Aminosäure in das Produkt keine Bildung einer Peptidbindung katalysiert werden muss, ist in dem zuständigen N-terminalen Initiations-Modul (A-PCP) keine C-Domäne vorhanden. Im Gegensatz hierzu enthält das C-terminale Terminations-Modul (C-A-PCP-Te) eine zusätzliche Te-Domäne, welche die Abspaltung des Produktes katalysiert.

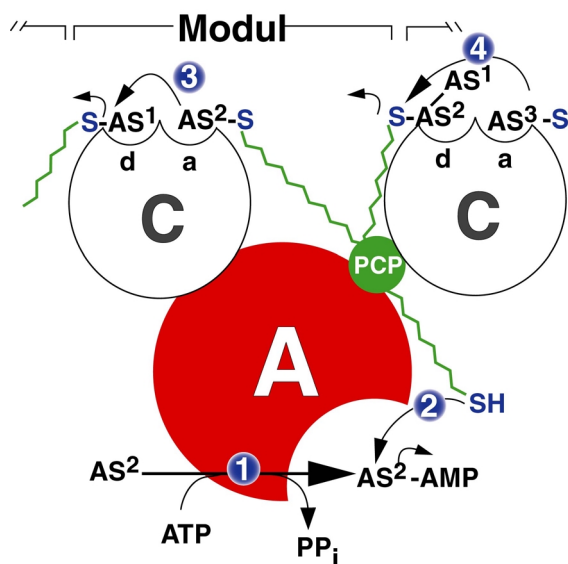


Abb. 2.3: Domänen-Organisation und Reaktions-Sequenz eines NRPS Elongations-Moduls

Ein Elongations-Modul besitzt die Domänen-Organisation C-A-PCP. (1) Die A-Domäne ist in der Lage, die Substrat-Aminosäure spezifisch zu erkennen und als Aminoacyl-Adenylat zu aktivieren. (2) Anschließend erfolgt die kovalente Bindung des aktivierten Substrates als Aminoacyl-Thioester auf dem Ppant Ko-Faktor der C-terminal assoziierten PCP-Domäne. (3) Durch Translokation des Aminoacyl-S-Ppant-Armes erfolgt der Transport des Substrates zur Akzeptor-Seite (a) der N-terminal assoziierten C-Domäne, welche die Bildung der Peptidbindung der beiden gebundenen Aminosäuren (AS1- und AS2-S-PCP) katalysiert. (4) Anschließend erfolgt der Transport des gebildeten Peptidyl-S-Ppant zur Donor-Seite (d) der C-terminal lokalisierten C-Domäne des Nachbar-Moduls. Durch den nukleophilen Angriff des folgenden AS3-S-Ppant kommt es dort zur Translokation der wachsenden Peptidkette (AS1-AS2) und zur Regeneration des HS-Ppant Ko-Faktors.

Neben den gerade beschriebenen Core-Domänen (siehe Abb. 2.2) können Module weitere, optionale Domänen enthalten, welche die Modifikation der als Thioester gebundenen Intermediate katalysieren. Mögliche Abwandlungen beinhalten u.a. eine Epimerisierung (→ E-Domäne), N-Methylierung (→ M-Domäne), Oxidation (→ Ox-Domänen) oder N-Formylierung (→ F-Domänen) des Aminoacyl- oder Peptidyl-S-PCP-Intermediates [Schwarzer & Marahiel, 2001]. Des Weiteren findet man häufig Thiazolin- und Oxazolin-Heterozyklen (siehe Abb. 2.1: Bleomycin und Bacitracin), deren Bildung durch spezialisierte Heterozyklisierungs-(Cy)-Domänen katalysiert wird. Diese ersetzen die C-Domäne des korrespondierenden Elongations-Moduls (Domänenorganisation: Cy-A-PCP) und übernehmen deren Funktion, in dem sie die Bildung der Peptidbindung katalysieren [Konz *et al.*, 1997]. Zusätzlich ist diese Domäne jedoch in der Lage, die Heterozyklisierung durch Kondensation des Seitengruppen-Hydroxyl- oder Thiol-Restes des Aminoacyl-S-PCP Akzeptors mit der Carbonyl-Gruppe der generierten Peptidbindung zu verwirklichen.

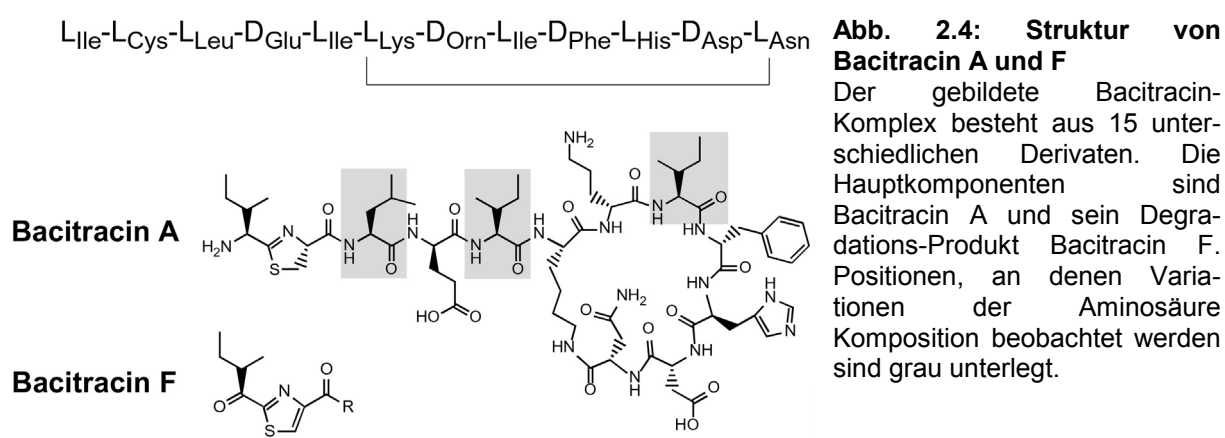
Aufgrund des geschilderten Biosynthese-Prinzips, bei dem aktivierte Substrate und Intermediate über Ppant-Kofaktoren kovalent als Thioester an die Protein-Template gebunden vorliegen, wird dieses Synthese-Konzept auch als *multiple carrier thiotemplate* Mechanismus bezeichnet [Stein *et al.*, 1996]. Basierend auf diesem Model wird die Größe, Primärstruktur und Modifikation des gebildeten Produktes durch die Anordnung und Spezifität der einzelnen Module und Domänen innerhalb des Proteintemplates determiniert. Diese Kolinearität zwischen dem Proteintemplat und dem gebildeten Produkt soll im Folgenden am Beispiel der nichtribosomalen Biosynthese der Peptidantibiotika Bacitracin und Surfactin detailliert beschrieben werden.

2.4 Das Peptidantibiotikum Bacitracin

Bacitracin gehört zur Gruppe der Homopeptid-Antibiotika, welche von spezialisierten *B. licheniformis* und *B. subtilis* Stämmen produziert werden [Azevedo *et al.*, 1993; Haavik & Froyshov, 1975; Johnson *et al.*, 1945]. Das gebildete Produkt stellt hierbei ein Gemisch aus 15 verschiedenen, zyklisch-verzweigten Dodecapeptiden mit der Hauptkomponente Bacitracin A (70%) dar (siehe Abb. 2.4) [Ikai *et al.*, 1992].

Bacitracin A besteht aus einer linearen N-terminalen Pentapeptid-Kette ((L_{Ile}-L_{Cys})Thiazolin-L_{Leu}-D_{Glu}-L_{Ile}) und einem C-terminalen Heptapeptid-Ring (L_{Lys}-D_{Orn}-L_{Ile}-D_{Phe}-L_{His}-D_{Asp}-L_{Asn}). Als strukturelle Besonderheit enthält das Molekül einen N-

terminalen Thiazolin-Ring, welcher aus den Aminosäuren L-Ile (Position 1) und L-Cys (Position 2) gebildet wird [Ishihara & Shimura, 1988]. Des weiteren sind in dem Dodecapeptid die nichtproteinogene Aminosäure D-Ornithin, sowie drei weitere Aminosäuren in ihrer D-Konfiguration (D-Glu, D-Phe und D-Asp) enthalten. Die Bildung des Degradationsproduktes Bacitracin F erfolgt durch Desaminierung des N-terminalen Amins (zum Keton) und Oxidation des Thiazolin-Rings (zum korrespondierenden Thiazol). Die Strukturen der 13 weiteren Derivate ähneln diesen beiden Bacitracinen, jedoch ist hier ein Austausch von bis zu drei L-Ile- bzw. L-Leu-Resten an den Positionen 3, 5 und 8 gegen L-Val zu beobachten [Ikai *et al.*, 1992].



Die antibiotische Aktivität von Bacitracin richtet sich in erster Linie gegen die Zellwand-Biosynthese von Gram-positiven Bakterien wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* und Neisserien. Bei Anwesenheit divalenter Metallionen wie z. B. Cd^{2+} , Mn^{2+} oder Zn^{2+} ist Bacitracin A aufgrund des vorhandenen N-terminalen Thiazolin-Ringes in der Lage, C_{55} -Isoprenyl-Pyrophosphat (IPP) zu komplexieren [Stone & Strominger, 1971; Storm & Strominger, 1973]. Dieser Membran-assoziierte Carrier (IPP) ist für den Transport der sich wiederholenden Peptidoglykan-Einheiten durch die Zellwand verantwortlich. Nach Übertragung der Einheiten, erfolgt die Dephosphorylierung des Carriers unter der Katalyse einer spezifischen Phosphatase. Das gebildete C_{55} -Isoprenyl-Phosphat (IP) steht anschließend wieder für einen neuen Transportzyklus zur Verfügung. Durch die Ausbildung eines ternären Komplexes aus IPP, Bacitracin und divalentem Kation kann die Dephosphorylierung von IPP inhibiert werden. Hierdurch kommt es zur Unterbrechung der Peptidoglykan-Biosynthese, sowie zur Akkumulation der UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid-Intermediate.

Des weiteren konnte für das Peptidantibiotikum Bacitracin ein inhibierender Einfluss auf die Proteinbiosynthese, auf Membranfunktionen, sowie auf Hydrolasen determiniert werden [Makinen, 1972; Rieber *et al.*, 1969; Schechter *et al.*, 1972].

In Kombination mit anderen Antibiotika wie Neomycin und Polymyxin B wurde Bacitracin in den 60er Jahren als Breitband-Antibiotikum zur Bekämpfung von *Staphylokokken*- und *Streptokokken*-Infektionen eingesetzt [Brunner, 1965]. Da jedoch für das Degradationsprodukt Bacitracin F eine hohe Nephrotoxizität (Nierentoxizität) nachgewiesen wurde, wird Bacitracin heutzutage nur noch zur dermatologischen Behandlung von Wundinfektionen, Verbrennungen und Transplantationen in Kombination mit Neomycin verwendet.

Die breiteste Anwendung von Bacitracin erfolgte bis 1999 als Ergotropikum in der modernen Tiermast. Hierbei konnte eine rasche und effektive Gewichtszunahme der behandelten Tiere bereits bei einer Konzentration von 5-100 ppm im Futtermittel beobachtet werden [Froyshov, 1984]. Obwohl die genauen Mechanismen nicht bekannt sind, geht man davon aus, dass es bei der Bacitracin-Behandlung zu einer positiven Verschiebung der Darmflora kommt, welche eine effizientere Ausnutzung der Nährstoffe ermöglicht [Walton, 1981].

2.4.1 Die Bacitracin-Biosynthese

Wie eine Vielzahl anderer Peptidantibiotika des Genus *Bacillus* erfolgt die Bacitracin-Biosynthese nichtribosomal an einer multimodularen Proteintemplat. Da jedes Modul - wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt - für die Aktivierung, Modifikation und den Einbau einer Aminosäure verantwortlich ist, besteht das molekulare Proteintemplat des Dodecapeptids Bacitracin aus zwölf Modulen, die auf die drei Synthetasen BacA (fünf Module; 598 kDa), BacB (zwei Module; 297 kDa) und BacC (fünf Module; 723 kDa) verteilt sind (siehe Abb. 2.5) [Konz *et al.*, 1997].

Die Bacitracin Synthetase A ist für die Bildung der linearen N-terminalen Pentapeptid-Kette ((L-Ile-L-Cys)_{Thiazolin}-L-Leu-D-Glu-L-Ile) verantwortlich. Hierbei ist im Elongations-Modul 2 der Austausch der C-Domäne gegen eine spezialisierte Cy-Domäne zu beobachten. Diese katalysiert die Knüpfung der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren L-Ile (Position 1) und L-Cys (Position 2), sowie die Kondensation der L-Cys-Seitenkette mit der *backbone* Carbonyl-Gruppe des L-Ile unter Bildung eines heterozyklischen Thiazolin-Ringes. Die Inkorporation der Substrat-Aminosäure D-Glu wird durch das Elongations-Modul 4 katalysiert. In diesem Modul ist eine

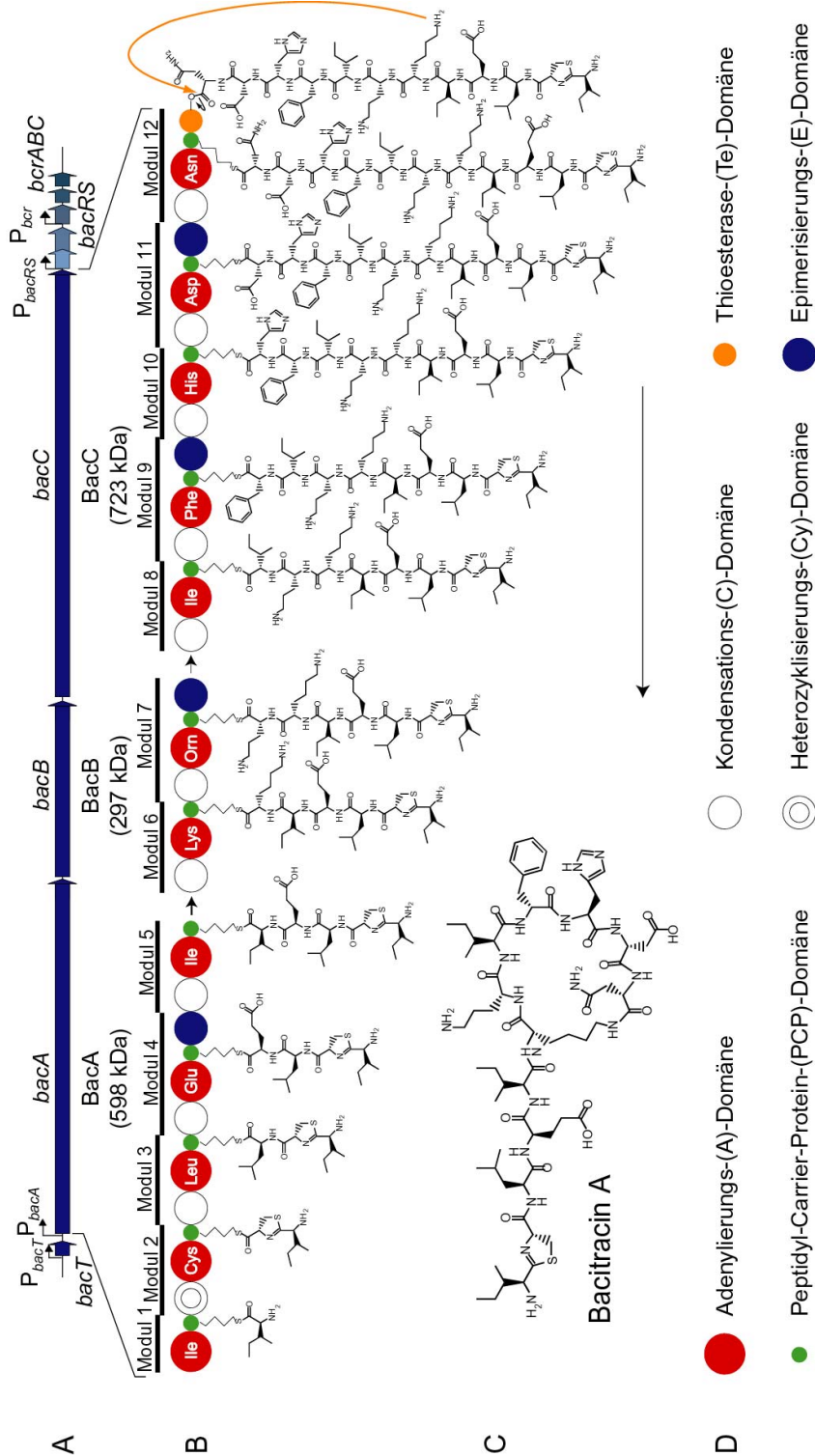


Abb. 2.5: Modulare Organisation des nichtribosomalen Proteintemplates der Bacitracin-Biosynthese

(A) Der Bacitracin-Biosynthese-Genkuster aus *B. licheniformis* ATCC 10716 kodiert für das nichtribosomale Proteintemplate zur Biosynthese des Peptidantibiotikums (C). (B) Dieses Proteintemplate besteht aus den drei Bacitracin Synthetasen BacABC, welche aus zwölf distinkten Modulen aufgebaut werden. Die Bildung des zyklisch-verzweigten Dodecapeptides erfolgt unter der katalytischen Kontrolle von 40 strukturell eigenständigen Domänen. Die spezifische Erkennung und Aktivierung der zwölf Substrat-Aminosäuren erfolgt hierbei durch die involvierten A- und PCP-Domänen. Während die zehn Peptidbindungen des Produktes von zehn C-Domänen gebildet werden, katalysiert die spezialisierte Cy-Domäne des Elongations-Moduls 2 die Bildung des Thiazolin-Heterozyklus zwischen L-Ile und L-Cys. Des Weiteren enthält das nichtribosomale Proteintemplate vier optionale E-Domänen, welche die Inkorporation der vier D-konfigurierten Aminosäuren ermöglichen. Die abschließende Freisetzung des zyklisch-verzweigten Produktes wird durch die C-terminale Te-Domäne des Terminations-Moduls 12 katalysiert. (D) Farb-Code der verwendeten Domänen.

optionale E-Domäne enthalten, welche die Konvertierung der kognaten Aminosäure L-Glu in die D-Konfiguration katalysiert.

Die Bildung des C-terminalen Heptapeptid-Ringes (L_{Lys}-D_{Orn}-L_{Ile}-D_{Phe}-L_{His}-D_{Asp}-L_{Asn}) wird von den sieben Modulen der Bacitracin Synthetasen B und C katalysiert. In den Elongations-Modulen 7, 9 und 11 ist wiederum die Insertion einer optionalen E-Domäne zu beobachten, welche die Konvertierung der L-konfigurierten Substrat-Aminosäure in ihre D-Konfiguration ermöglicht. Die Abspaltung des zyklisch-verzeigten Produktes erfolgt unter der katalytischen Kontrolle der Te-Domäne des Terminations-Moduls 12. Hierbei kommt es zum nukleophilen Angriff der ϵ -Amino-Gruppe des L-Lys (Position 6) auf die α -Carboxyl-Gruppe des terminalen L-Asn (Position 12), wodurch es unter Zyklisierung zur Bildung eines Lactam-Ringes kommt.

Die Konvertierung der zwölf PCP-Domänen in ihre phosphopantetheinylierte, aktive holo-Form erfolgt unter der katalytischen Kontrolle der spezialisierten PPTase Bli [Gaidenko & Khaikinson, 1988], deren kodierendes Gen *bli* kürzlich in der chromosomalen Region stromabwärts des Lichenysin-Biosynthese-Genklusters lokalisiert werden konnte [Neumüller & Marahiel, 2001].

Stromaufwärts der drei Synthetase-Gene *bacABC* konnte ein weiterer offener Leserahmen (*bacT*) lokalisiert werden, welcher für die putative TypII-Thioesterase BacT (27 kDa) dieses Systems kodiert [Konz *et al.*, 1997]. Man geht davon aus, dass es sich bei dieser Klasse um eine Art von "Reinigungs-Enzymen" handelt, deren positiver Einfluss auf die Produktivität des Proteintemplates nachgewiesen werden konnte [Schneider & Marahiel, 1998; Schwarzer *et al.*, 2002].

Stromabwärts der drei Synthetase-Gene konnte die Anwesenheit der kodierenden Gene des Zwei-Komponenten-Systems BacRS (27,4 und 39,5 kDa), sowie des ABC-Transporters BcrABC (34,5, 23,3 und 23,1 kDa) determiniert werden, welche an der Ausbildung der Resistenz gegen das produzierte Peptidantibiotikum Bacitracin beteiligt sind (siehe hierzu auch Kapitel 2.8.3) [Neumüller *et al.*, 2001].

2.5 Das Lipoheptapeptid Surfactin

Das zyklische Biotensid Surfactin, welches in verschiedenen *B. subtilis* Stämmen produziert wird, besteht aus einer β -Hydroxy-Fettsäure (C_{13} - C_{15}), die über eine Amid- und eine Lacton-Bindung mit den beiden Enden der Heptapeptidkette (L_{Glu} - L_{Leu} - D_{Leu} - L_{Val} - L_{Asp} - D_{Leu} - L_{Leu}) verbunden ist [Arima *et al.*, 1968]. Neben Variationen β -Hydroxy-Fettsäure-Länge, konnten Surfactin-Derivate mit einem Austausch der Aminosäure L-Leu an Position 7 gegen L-Val und L-Ile beobachtet werden.

β -Hydroxy-Fettsäure- L_{Glu} - L_{Leu} - D_{Leu} - L_{Val} - L_{Asp} - D_{Leu} - L_{Leu}

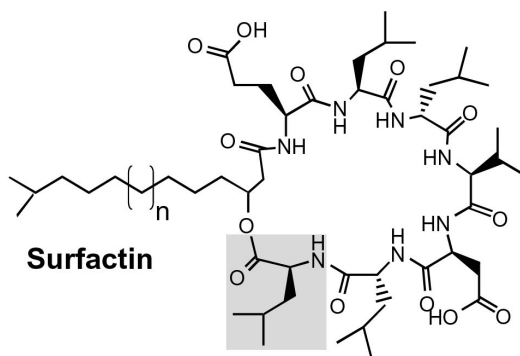


Abb. 2.6: Chemische Struktur des Lipoheptapeptides Surfactin

Surfactin stellt ein Gemisch aus verschiedenen zyklischen Lipoheptapeptiden dar, welche sich in der Länge der eingebauten β -Hydroxy-Fettsäure ($n = 1-3$) unterscheiden. Die Position sieben, an der Variationen der Aminosäure Komposition beobachtet werden, ist grau unterlegt.

Aufgrund seines hydrophob/hydrophilen Charakters ist Surfactin in der Lage, die Oberflächenspannung von Wasser von 72 mN m^{-1} auf 27 mN m^{-1} zu reduzieren [Peypoux *et al.*, 1999]. Hierdurch stellt Surfactin eines der stärksten, bekannten Biotenside und – aufgrund seiner biologischen Abbaubarkeit – eine für industrielle Applikationen interessante Alternative zu chemischen Tensiden dar, für die ein schädlicher Einfluss auf die Umwelt determiniert werden konnte.

Kürzlich wurden weitere Bioaktivitäten für diesen Naturstoff nachgewiesen, wie z. B. die Fähigkeit zur Schaum- und Emulsionsbildung [Razafindralambo *et al.*, 1998], sowie die Inhibition der Oozyten-Reifung und der Fibringerinnung [Arima, *et al.*, 1968; Toraya *et al.*, 1995]. Weiterhin konnte eine antibakterielle, antitumorale, antimycoplasmatische und antivirale Wirkung des Lipoheptapeptids Surfactin gezeigt werden [Kameda & Imai, 1985; Tsukagoshi *et al.*, 1970; Vollenbroich *et al.*, 1997].

2.5.1 Die Biosynthese des Lipopeptides Surfactin

Das Proteintemplat zur nichtribosomalen Biosynthese des zyklischen Lipopeptids Surfactin besteht aus sieben Modulen, die auf die drei Synthetasen SrfA-A (402 kDa), SrfA-B (401 kDa) und SrfA-C (144 kDa) verteilt sind (siehe Abb. 2.7).

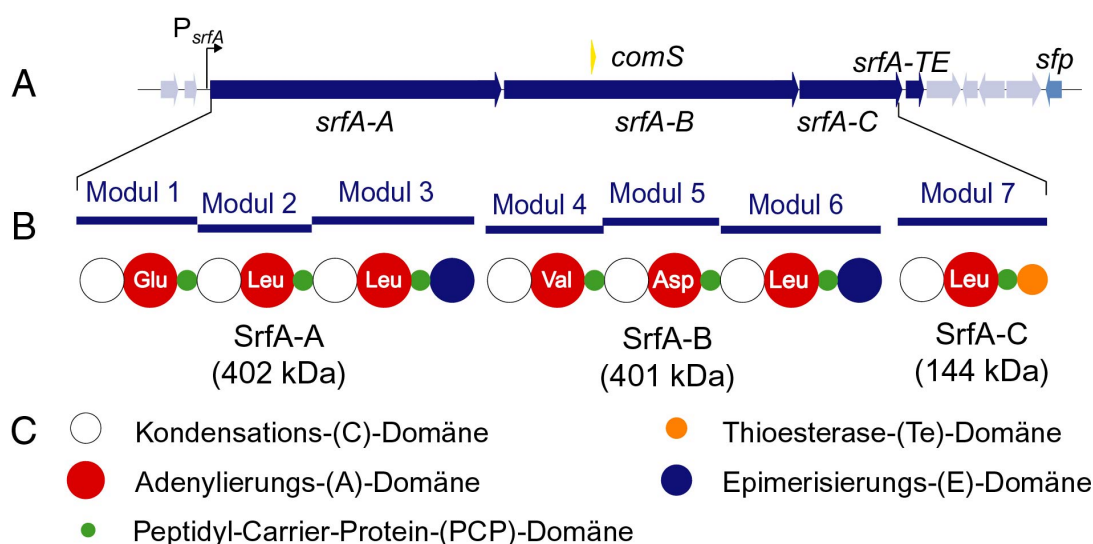


Abb. 2.7: Das Surfactin-Biosynthese-Gencluster

(A) Gezeigt ist die chromosomale Region des Surfactin-Biosynthese-Genclusters (*srfA*) aus *B. subtilis* ATCC 21332, welches aus den Genen *srfA-ABCTE* aufgebaut wird. Das kodierte, nichtribosomale Proteintemplat wird aus den sieben Modulen der drei Surfactin Synthetasen SrfA-ABC gebildet (B). In (C) ist der Farb-Code der 24 verwendeten Domänen aufgezeigt.

Die Initiation der Surfactin-Biosynthese erfolgt durch Übertragung der β -Hydroxy-Fettsäure auf die erste, durch SrfA-A aktivierte Aminosäure L-Glu. Im Gegensatz zum Bacitracin startet das Proteintemplat des Surfactins also mit einem Elongations-Modul, wobei die inhärente C-Domäne die Bildung der Peptidbindung zwischen der α -Carboxyl-Gruppe der Fettsäure und der α -Amino-Gruppe des L-Glu (Position 1) katalysiert. Als Donor der Acyl-Gruppe fungiert hierbei eine ca. 40kDa-große, CoASH-abhängige Transacylase [Menkhaus *et al.*, 1993].

Die weitere Synthese des Lipopeptides erfolgt anschließend an den Elongations-Modulen 2 bis 7. Hierbei findet an den Positionen 3 und 6 eine Konvertierung der aktivierten Substrat-Aminosäure L-Leu in die D-Konfiguration statt. Dies erfolgt unter der katalytischen Kontrolle der in den entsprechenden Elongations-Modulen enthaltenen, optionalen E-Domäne. Die Abspaltung des zyklischen Lipopeptides wird durch die Te-Domäne des C-terminalen Terminations-Moduls 7 katalysiert. Hierbei kommt es zum nukleophilen Angriff der β -Hydroxy-Gruppe der

gebundenen Fettsäure auf die α -Carboxyl-Gruppe des L-Leu (Position 7). Die strukturelle Basis für die resultierende Lactonisierung des Lipoheptapeptides Surfactin konnte kürzlich durch die Lösung der Kristallstruktur dieser internen Te-Domäne aufgeklärt werden (siehe hierzu auch Kapitel 2.6.3) [Bruner *et al.*, 2002].

Neben den drei Synthetase-Genen enthält das 26kb-umfassende Surfactin-Biosynthese-Genkluster ein weiteres Gen (*srfA-TE*), welches für die putative TypII-Thioesterase SrfA-TE (28 kDa) kodiert [Cosmina *et al.*, 1993]. Hierbei handelt es sich vermutlich um eine Art "Reinigungs-Enzym", dessen positiver Einfluss auf die Produktivität des Surfactin-Biosynthese-Templates nachgewiesen werden konnte [Schneider & Marahiel, 1998; Schwarzer *et al.*, 2002].

Stromabwärts des Surfactin-Biosynthese-Genclusters konnte in einer Entfernung von ca. 4 kb das Gen *sfp* lokalisiert werden. Dieses Gen kodiert für die spezialisierte PPTase Sfp, welche die Konvertierung der sieben PCP-Domänen der drei Surfactin-Synthetasen in die phosphopantetheinylierte, aktive holo-Form katalysiert. Dieses Protein repräsentiert das wohl am besten charakterisierte Mitglied der Familie der PPTasen [Quadri *et al.*, 1998] und hat sich zu einem wichtigen Werkzeug zur *in vitro*- und *in vivo*-Modifikation von rekombinanten NRPSs, Polyketid-Synthasen und Fettsäure-Synthasen Carrier-Protein-Domänen entwickelt (siehe hierzu auch Kapitel 2.8.2) [Lambalot *et al.*, 1996; Pfeifer & Khosla, 2001].

2.6 Gerichtete Manipulation von NRPSs zum rationalen Design neuer Peptidantibiotika

Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, wird bei der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese die Primärstruktur des Produktes durch die Anordnung, Anzahl und Spezifität der einzelnen Module und Domänen innerhalb des multimodularen Proteintemplates bestimmt.

Anhand der heterologen Produktion von funktionellen, distinkten A-, PCP- und Te-Domänen konnte die Unabhängigkeit der Aktivität dieser katalytischen Unter-einheiten von der modularen Umgebung des vollständigen Proteins determiniert werden [Dieckmann *et al.*, 1995; Kohli *et al.*, 2001; Stachelhaus *et al.*, 1996a; Stachelhaus & Marahiel, 1995; Trauger *et al.*, 2000]. Die Aufklärung der 3D-Strukturen der Core-Domänen (C-, A-, PCP- und Te-Domäne) eröffneten darüber hinaus direkte Einblicke in die molekulare Funktionsweise der individuellen Domänen, sowie des gesamten,

modularen NRPS-Fließbandes [Bruner *et al.*, 2002; Conti *et al.*, 1997; Keating *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2000].

Unter Ausnutzung dieser biochemischen und strukturellen Daten war es möglich, die distinkten Grenzen zwischen einzelnen Domänen bzw. vollständigen Modulen zu determinieren. Diese Informationen eröffnen ihrerseits die Möglichkeit zur gezielten Veränderung des nichtribosomalen Biosynthese-Apparates zum Zwecke des rationalen Designs innovativer Peptidantibiotika [Mootz & Marahiel, 1999; Walsh, 2002]. Die unterschiedlichen Strategien zur gerichteten Manipulation von NRPS-Proteintemplaten sind in Abb. 2.8 schematisch dargestellt und sollen nachfolgend - insbesondere im Hinblick auf Ihre Vor- und Nachteile - kurz diskutiert werden.

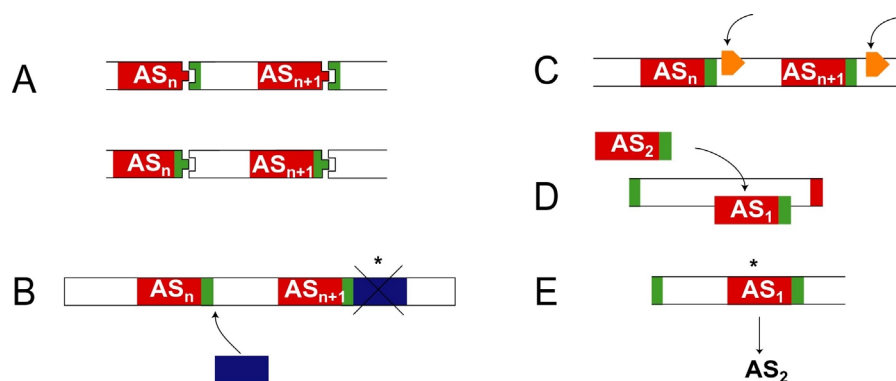


Abb. 2.8: Strategien zur gerichteten Manipulation von nichtribosomalen Proteintemplaten zum rationalen Design neuartiger Peptidantibiotika

(A) Durch die Fusion von vollständigen Modulen ist es möglich, artifizielle, funktionelle Hybridsynthetasen zu generieren. (B) Durch Einführung oder Deletion von optionalen Domänen können einzelne Aminosäure-Reste innerhalb eines Peptidproduktes gezielt modifiziert werden. (C) Bei der Translokation der Thioesterase-(Te)-Domäne kommt es zur vorzeitigen Freisetzung von Biosynthese-Intermediaten und somit zur Bildung verkürzter Peptide. (D) Der Austausch von Minimal-Modulen (A-PCP) unterschiedlicher Spezifität führt zum Austausch der korrespondierenden Aminosäure im Peptid-Produkt. (E) Durch ortsgerichtete Mutagenese ist es möglich, die Selektivität von A-Domänen zu verändern, welche zum Einbau des alternativen Substrates in das Peptid-Produkt führt.

2.6.1 Konstruktion von artifiziellen Hybridsynthetasen mittels Modulfusion

Die zuletzt am weitesten verbreitete Methode zur gerichteten Manipulation von nichtribosomalen Proteintemplaten stellt die Modulfusion dar [Doekel & Marahiel, 2000; Mootz *et al.*, 2000]. Hierbei werden *de novo* artifizielle und funktionelle Hybridsynthetasen konstruiert, die in der Lage sind, die Synthese von kurzen Peptiden *in vitro* zu katalysieren. Von essentieller Bedeutung zur Durchführung solcher Modulfusionen ist natürlich (i) die Definition eines Moduls (\rightarrow Domänenabfolge), sowie (ii) die Auswahl einer geeigneten Fusionsstelle.

So muss bei der Definition eines Moduls berücksichtigt werden, dass die C-Domäne eine Editier- und Steuerungsfunktion für die nichtribosomale Biosynthese besitzt [Belshaw *et al.*, 1999; Ehmann *et al.*, 2000]. Durch die Verwendung von Aminoacyl-*N*-Acetyl-Cysteamin-Derivaten (Aminoacyl-SNACs), welche Analoga des nativen C-Domänen Substrates Aminoacyl-S-PCP darstellen, konnte nachgewiesen werden, dass die C-Domäne nur eine Enantioselektivität für das stromaufwärts lokalisierte Aminoacyl-/Peptidyl-S-PCP Donor-Substrat aufweist, während die Erkennung des stromabwärts lokalisierten Aminoacyl-S-PCP Akzeptor-Substrates sowohl Substrat- als auch Enantio-selektiv verläuft. Aufgrund dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass bei Modulfusionen die Verbindung zwischen den Substrat-spezifischen C- und A-Domänen nicht getrennt werden darf. Somit stellt sich die Definition eines Moduls als C-A-PCP- bzw. PCP-C-A-Einheit als vorteilhaft dar, während die Verwendung der Modul-Definition A-PCP-C auf Grund der inhärenten Akzeptor-Selektivität der C-Domäne problematisch sein dürfte.

Anhand von Sequenzvergleichen, sowie mittels partieller Proteolyse von NRPSs konnten kurze Protein-Bereiche von geringer Homologie zwischen den strukturell-eigenständigen Domänen determiniert werden [Dieckmann *et al.*, 1999]. Diese sogenannten Linker-Regionen sind besonders reich an kleinen, hydrophilen Aminosäuren und bieten sich als Fusionsstellen zwischen Modulen an [Doekel & Marahiel, 2000; Mootz *et al.*, 2000]. Bei der Verwendung dieser intermodularen Linker-Regionen kann davon ausgegangen werden, dass die fusionierten Module in produktiver Weise miteinander kommunizieren können. Dies konnte durch die erfolgreiche Konstruktion funktioneller Hybridsynthetasen mittels Modulfusion innerhalb der Linker-Regionen zwischen PCP-C, sowie A-PCP auch tatsächlich gezeigt werden [Doekel & Marahiel, 2000; Mootz *et al.*, 2000].

Neben der Verwendung der gerade beschriebenen intermodularen Linker-Regionen wurde auch versucht, die Fusionsstellen auf intramodulare, hochkonservierte Sequenzmotive zu legen (siehe Kapitel 9.4) [Symmank *et al.*, 1999; Yakimov *et al.*, 2000]. Hierbei zeigte sich jedoch, dass Fusionen auf den Konsensus-Sequenzen der A-Domäne (Core A8 **GRxDxQVKIRGxRIELGEIE**, Fusionsstelle fett hervorgehoben) und der PCP-Domäne (CoreT DxFFxxLGG(HD)**S**(LI)) zu inaktiven Hybridsynthetasen führten. Einzig die Fusion zweier hochhomologer Module auf dem Core-Motiv C3 der C-Domäne (Core C3 **MHHxISDG**(WV)**S**) führte zu einer funktionellen Hybridsynthetase, die in der Lage war die Substrate spezifisch zu

erkennen, zu aktivieren und anschließend die Bildung der Peptidbindungen zu katalysieren.

Erstaunlicherweise erwies sich also gerade die Fusion innerhalb der geringer konservierten C-Domäne als erfolgreich, während Fusionen innerhalb der hochkonservierten A- und PCP-Domänen zu inaktiven Proteinen führten.

2.6.2 Einführung und Deletion von optionalen Domänen in nichtribosomalen Proteintemplaten

Im Gegensatz zur Modulfusion sind bislang nur wenige Beispiele für die erfolgreiche Einführung bzw. Deletion von optionalen Domänen in Proteintemplate beschrieben worden.

Die optionalen E-Domänen sind C-terminal von der PCP-Domäne eines Moduls lokalisiert und katalysieren die Konvertierung einer L-Aminosäure zum entsprechenden D-Isomer [Stachelhaus & Walsh, 2000]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Epimerisierung von Aminosäuren, welche von Elongations-Modulen in das Produkt eingebaut werden, erst auf der Stufe des Peptidyl-S-PCP-Intermediates erfolgt [Schwecke *et al.*, 1992]. Anhand der Konstruktion von Hybridsynthetasen, sowie durch Mis-Priming-Experimente konnte eine breite Substrat-Toleranz dieser optionalen Domäne determiniert werden [Belshaw *et al.*, 1999; Linne *et al.*, 2001]. Hierbei war jedoch zu beobachten, dass eine effiziente Substrat-Epimerisierung auch von der Herkunft der vorangehenden PCP-Domäne abhängig ist, was in erster Linie auf Unterschiede innerhalb der Konsensus-Sequenz des Core T's der PCP-Domänen zurückgeführt werden kann [Linne *et al.*, 2001]. Während PCP-Domänen, die in C-terminaler Fusion zu einer C-Domäne stehen das Core T-Motiv GG~~H~~SL besitzen, wird in PCP-Domänen, die C-terminal mit einer E-Domäne verknüpft sind, das veränderte Core-T-Motiv GG~~D~~SI (Variationen sind in fett hervorgehoben) gefunden. Es wurde vermutet, dass diese Sequenzunterschiede für eine effiziente Interaktion des Aminoacyl- bzw. Peptidyl-S-PCPs mit der assoziierten E-Domäne notwendig sind. In der Tat konnte dies durch Mutations-Analysen für den Aspartat-Rest (D) innerhalb des veränderten Core T-Motivs gezeigt werden [Linne *et al.*, 2001]. Bei der Einführung einer optionalen E-Domäne in ein NRPS-Proteintemplat muss also auch ein Austausch der spezialisierten PCP-Domäne in dem Proteintemplat erfolgen.

Des weiteren ist zu beachten, dass die C-Domäne des nachfolgenden Elongations-Moduls wie in Kapitel 2.6.1 dargelegt eine Enantioselektivität für den Aminoacyl- bzw. Peptidyl-S-PCPs Donor besitzt [Linne *et al.*, 2001; Stachelhaus & Walsh,

2000]. Auch hier müsste also gegebenenfalls der Austausch gegen eine geeignete C-Domäne mit Selektivität für D-konfigurierte Acyl-Donor-Moleküle erfolgen.

Im Gegensatz zu E-Domänen, die C-terminal an ein C-A-PCP Modul fusioniert sind, stellen die optionalen *N*-Methylierungs-(M)-Domänen eine Insertion zwischen Core 8 und 9 der korrespondierenden A-Domäne dar [Haese *et al.*, 1993]. Darüber hinaus erfolgt die *N*-Methylierung nicht auf Peptidylebene, sondern bereits auf der Stufe des Aminoacyl-S-PCP Intermediates [Schauwecker *et al.*, 2000]. Am Beispiel der Actinomycin-Synthetase 2 (Domänenorganisation: C-A_{Thr}-PCP-C-**A_{Val}**-PCP-E) konnte der Austausch der Valin-selektiven A-Domäne (in fett hervorgehoben) gegen das korrespondierende *N*-Methyl-Valin-selektive A_{Val}(M)-Didomänen-Fragment der Actinomycin-Synthetase 3 aufgezeigt werden. Die entsprechende Hybridsynthetase (Domänenorganisation: C-A_{Thr}-PCP-C-**A_{Val}(M)**-PCP-E) war in der Lage, die *N*-methylierte Aminosäure in das Peptidprodukt zu inkorporieren, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die assoziierte C-Domäne das alternative *N*-Methylvalin-Substrat nicht diskriminiert und die Akzeptor-Bindungstasche offensichtlich tolerant gegenüber dieser Modifikation ist. Dies gilt nicht für die C-terminal lokalisierte E-Domäne, da keine Epimerisierung des *N*-methylierten Peptidyl-S-PCP Intermediates beobachtet werden konnte.

2.6.3 Abspaltung von verkürzten Peptiden durch die Translokation der Thioesterase-(Te)-Domäne

Die Portabilität der Te-Domäne zur Abspaltung kleiner Peptide wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt. So konnte am Beispiel der durch Modulfusion generierten Hybridsynthetasen demonstriert werden (siehe 2.6.1.), dass die vollständige Aktivität der generierten artifiziellen Proteintemplate neben der Aktivierung und Verknüpfung der Substrat-Aminosäuren auch von der effizienten Abspaltung der gebildeten Peptid-Produkte abhängt [Doekel & Marahiel, 2000; Mootz *et al.*, 2000; Schwarzer *et al.*, 2001]. In Anwesenheit einer C-terminal fusionierten Te-Domäne konnte eine effiziente hydrolytische Freisetzung der erwarteten linearen Di- und Tripeptide erreicht und die Synthese unerwünschter Nebenprodukte unterdrückt werden. Hierbei waren die Umsatzraten der artifiziellen Proteintemplate mit Wildtyp-Synthetasen vergleichbar.

Analoge *in vivo*-Untersuchungen erfolgten am Beispiel des Surfactin-Biosynthese-Systems, in dem die frühzeitige Termination der Peptid-Biosynthese durch die Translokation der Te-Domäne analysiert wurde [de Ferra *et al.*, 1997]. Hierbei wurde die Te-Domäne des Terminations-Moduls 7 an den jeweiligen C-Terminus der internen Elongations-Module 4 und 5 fusioniert (vgl. Abb. 2.7). In den resultierenden Konstrukten konnte die Produktion der verkürzten Lipotetra- und Lipopentapeptide nachgewiesen werden. Obwohl die Te-Domäne jedoch normalerweise eine Zyklisierung des generierten Lipoheptapeptides katalysiert, konnte in den artifiziellen Systemen nur die Synthese der linearen Lipopeptide beobachtet werden. Offensichtlich schien die translokalisierte Te-Domäne lediglich in der Lage zu sein, die C-terminal verkürzten Produkte unter Hydrolyse vom Proteintemplat abzuspalten.

Durch Aufklärung der Kristallstruktur der C-terminalen Te-Domäne des Surfactin-Biosynthese-Systems konnte kürzlich die strukturelle Basis für diese Beobachtung determiniert werden [Bruner *et al.*, 2002]. Demnach besitzt die Te-Domäne eine Topf-artige Substrat-Bindungstasche, an deren Rand das lineare Lipopeptid-Substrat gebogen vorliegt. Durch diese Anlagerung wird die β -Hydroxy-Gruppe der Fettsäure in der Nähe des katalytischen Zentrum positioniert, in dem die C-terminale Carbonyl-Gruppe des Lipoheptapeptides an den hochkonservierten Serin-Rest der katalytischen Triade gebundenen vorliegt. Im Falle der verkürzten Lipotetra- und Lipopentapeptide kommt wahrscheinlich die β -Hydroxy-Gruppe der Fettsäure nicht mehr in die produktive Nähe zum aktiven Zentrum. Daher muss sie wahrscheinlich durch ein alternatives Nukleophil, wie z. B. Wasser, ersetzt werden, wodurch es zur hydrolytischen Freisetzung der linearen Produkte kommt.

2.6.4 Austausch und Deletion von Modulen innerhalb eines vollständigen NRP-Biosynthese-Systems

Wie das letzte Beispiel zeigt, sind Experimente zur gerichteten Manipulation von nichtribosomalen Proteintemplaten nicht auf die biochemische *in vitro*-Charakterisierung der konstruierten, artifiziellen Hybridsynthetasen beschränkt. Vielmehr ist es durch die genetische Manipulation eines vollständigen NRP-Biosynthese-Genklusters möglich, die Produktion von neuen, veränderten Peptidantibiotika *in vivo* herbeizuführen.

Aufgrund der breiten Bioaktivität des Lipoheptapeptides, sowie der guten genetischen Zugänglichkeit des Produzentenstammes *B. subtilis* ATCC 21332, stellt das Surfactin-Biosynthese-Gencluster ein geeignetes Modellsystem für derartige *in*

vivo-Manipulationen dar (siehe Abb. 2.7). Neben der bereits gezeigten Translokation der Te-Domäne wurden an diesem System auch die ersten Modulaustausche zum rationalen Design neuer Lipoheptapeptide durchgeführt.

Die ersten *in vivo*-Manipulationen des Surfactin-Biosynthese-Systems beschränkten sich auf den Austausch von sogenannten Minimalmodulen [Schneider *et al.*, 1998; Stachelhaus *et al.*, 1995]. Hierbei konnte am Beispiel der Elongations-Module 2 und 7 aufgezeigt werden, dass die Substitution der enthaltenen A- und PCP-Domänen - gegen heterologe Minimalmodule mit unterschiedlicher Substrat-Selektivität - zum Austausch der korrespondierenden, variablen Aminosäure L-Leu im Peptidprodukt führt und so die neuen Lipoheptapeptid-Derivate [Orn²]-, [Orn⁷]-, [Cys⁷]- und [Phe⁷]-Surfactin erhalten werden können [Schneider *et al.*, 1998; Stachelhaus *et al.*, 1995].

Beim Austausch der A-PCP-Minimalmodule kommt es zur artifiziellen Fusion zwischen den PCP- und C-, sowie C- und A-Domänen. Während die Funktionalität von PCP-C-Fusionen am Beispiel der *de novo* Synthese von kurzen Peptiden demonstriert werden konnte [Doekel & Marahiel, 2000], stellt sich die Fusion von C- und A-Domänen aufgrund der inhärenten Akzeptor-Selektivität der C-Domäne als problematisch dar [Belshaw *et al.*, 1999; Ehmann *et al.*, 2000]. Zur Umgehung dieser Problematik beschäftigen sich daher neuere Ansätze mit dem Austausch bzw. der Deletion von vollständigen C-A-PCP-Modulen [Mootz *et al.*, 2002b; Yakimov *et al.*, 2000]. Die Untersuchungen von Mootz *et al.* beschränkten sich hierbei auf die Deletion bzw. den Austausch des Leucin-selektiven Elongations-Moduls 2 der Surfactin-Synthetase SrfA-A. Hierbei führte die Deletion des Elongations-Moduls 2 zur erwarteten Produktion des verkürzten, zyklischen Lipoheptapeptides Δ^2 -Surfactin [Mootz *et al.*, 2002b].

Ein generelles Problem bei all den angeführten Beispielen zur genetischen Manipulation von NRPSs war die drastische Einbuße an Produktivität der artifiziellen Proteintemplate. Zwar konnte in den meisten Fällen die Produktion der neuen Lipoheptapeptid-Derivate in den konstruierten *B. subtilis* Stämmen determiniert werden, jedoch war dies stets mit einer drastischen Reduktion an Produkt-Ausbeute verbunden. Da selbst der Austausch heterologer Module gleicher Substrat-Selektivität zu einer erniedrigten Produktbildung führte, kann ein negativer Einfluss (z. B. Toxizität bzw. unzureichender Export) des veränderten Produktes - zumindest als Hauptursache - ausgeschlossen werden [Mootz *et al.*, 2002b; Stachelhaus *et al.*, 1995].

Wahrscheinlicher scheint die Annahme zu sein, dass die verminderte Produktivität von veränderten NRPS auf die enormen Eingriffe in die Proteintemplate zurückzuführen sind, die beim Austausch von vollständigen Modulen bzw. der Translokation der Te-Domäne hervorgerufen werden. Hierdurch können Störungen der inter- und intramodularen Kommunikation, sowie der Tertiärstruktur der Hybrid-synthetasen verursacht werden, welche die Herabsetzung der Produktbildungsrate erklären würden. Unterstützt wird diese Theorie durch die bislang einzige Manipulation, bei der keine Reduktion der Produktivität beobachtet wurde. Hierbei konnten Störungen des Proteintemplates durch den Austausch der beiden sehr homologen (ca. 60%) Elongations-Module 1 des Surfactin- bzw. Lichenysin-Biosynthese-Genklusters (Substrat-Selektivität für L-Glu bzw. L-Gln; beide aus *B. subtilis*) auf ein Minimum reduziert werden. Entsprechend wurde keine Herabsetzung bei der Produktion des neuen [Gln¹]-Surfactin Derivates beobachtet [Yakimov *et al.*, 2000].

2.7 Veränderung der Substrat-Selektivität von Adenylierungs-(A)-A-Domänen

Die im Kapitel 2.6 beschriebenen Methoden zur gerichteten Manipulation von nichtribosomalen Proteintemplaten sind auf die Fusion, Deletion und Insertion, sowie den Austausch von einzelnen Domänen und vollständigen Modulen limitiert. Bei all diesen Veränderungen kommt es jedoch zu enormen Eingriffen in das nicht-ribosomale Proteintemplat, so dass Störungen der inter- und intramodularen Kommunikation, sowie der Tertiärstruktur nicht ausgeschlossen werden können. Eine schonendere Methode, bei der die Eingriffe in das molekulare Proteintemplat auf den Austausch weniger Aminosäure-Reste begrenzt werden kann, leitet sich aus dem kürzlich aufgeklärten nichtribosomalen Kode von NRPS Adenylierungs-(A)-Domänen ab.

Die A-Domänen sind die Schlüsselbausteine eines NRPS Moduls, da sie die Substrat-Aminosäure spezifisch aus dem Pool aller verfügbaren Aminosäuren auswählen und unter ATP-Hydrolyse als Aminoacyl-Adenylat aktivieren. Sie determinieren somit die Substrat-Selektivität des korrespondierenden Moduls des nichtribosomalen Proteintemplates. Am Beispiel des Initiations-Moduls des Gramicidin S-Biosynthese-Systems (Domänenorganisation: A-PCP-E) konnte gezeigt werden, dass die A-Domäne ca. 550 Aminosäure-Reste umfasst und als strukturell-

eigenständiges Enzym agieren kann [Stachelhaus & Marahiel, 1995]. Durch die Aufklärung der Kristallstruktur dieser Phenylalanin-selektiven A-Domäne (PheA) konnte - in Gegenwart ihrer Substrate Phenylalanin und ATP - ein direkter Einblick in die strukturelle Basis der Substrat-Erkennung gewonnen werden (siehe Abb. 2.9) [Conti *et al.*, 1997]. Diese Informationen ermöglichten anschließend die Aufklärung des Selektivitäts-vermittelnden Kodes von NRPS A-Domänen und - durch Anwendung von ortsgerichteter Mutagenese - die gezielte Veränderung der Substrat-Selektivität von NRPSs [Stachelhaus *et al.*, 1999].

2.7.1 Die Kristallstruktur der Phenylalanin-selektiven A-Domäne PheA

Die ca. 550 Aminosäure-umfassende, Phenylalanin-selektive A-Domäne PheA wird aus einer großen N-terminalen und einer kleinen C-terminalen Untereinheit aufgebaut (siehe Abb. 2.9). Die Substrat-selektive Bindungstasche liegt an der Grenzfläche zwischen beiden Untereinheiten und ist von den zehn, hochkonservierten Core-Motiven A1 bis A10 umgeben. Für die meisten dieser Core-Sequenzen konnte ein direkter Einfluss auf die ATP-Bindung und -Hydrolyse nachgewiesen werden [Gocht & Marahiel, 1994; Pavela-Vrancic *et al.*, 1994a; Pavela-Vrancic *et al.*, 1994b; Saito *et al.*, 1995].

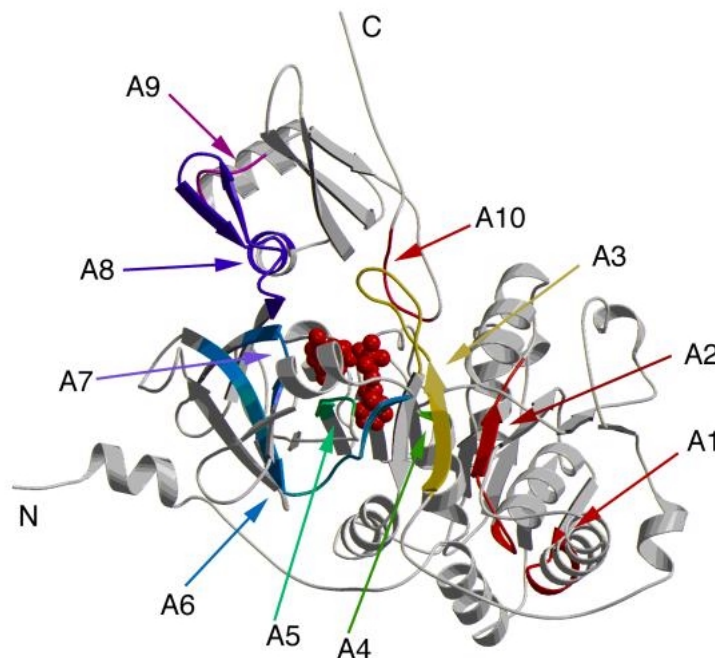


Abb. 2.9: Kristallstruktur der Phenylalanin-selektiven A-Domäne PheA

Die A-Domäne PheA wird aus einer großen N-terminalen und einer kleinen C-terminalen Untereinheit gebildet. Das Substrat Phenylalanin (rot) und AMP (orange) sind an den Grenzflächen der beiden Untereinheiten gebunden. Die Lage der Core-Sequenzen A1 bis A10 sind durch Pfeile markiert. Zeichnung nach [Stachelhaus *et al.*, 1999]

Im Gegensatz hierzu wird die Phenylalanin-selektive Bindungstasche hauptsächlich aus Aminosäure-Resten aufgebaut, welche innerhalb einer hochvariablen, ca. 100 Aminosäure-umfassenden Region zwischen den Core-Sequenzen A4 und A5 lokalisiert ist (siehe Abb. 2.10) [Conti *et al.*, 1997].

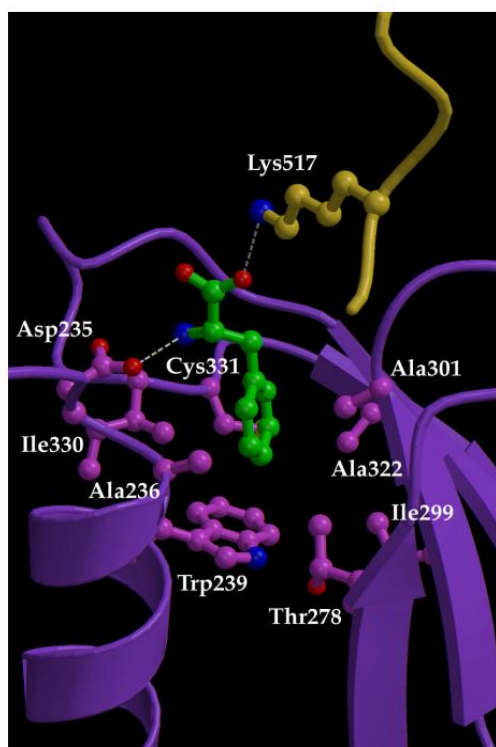


Abb. 2.10: Die Phenylalanin-selektive Bindungstasche von PheA

Die Phenylalanin-selektive Bindungstasche wird aus zehn Aminosäure-Resten aufgebaut. Asp235 und Lys517 bilden elektrostatische Wechselwirkungen mit der α -Amino und α -Carboxyl-Gruppe der Substrat-Aminosäure aus (gestrichelte Linien). Auf der linken Seite wird die Substrat-Bindungstasche durch die Aminosäure-Reste Ala236, Ile330 und Cys331 aufgebaut, während die rechte Seite durch die Reste Ala322, Ala 301, Ile 299 und Thr278 gebildet wird. Die beiden Seiten werden durch den Indol-Ring des Trp239 am Boden der Bindungs-Tasche voneinander getrennt. Die Lokalisation der Substrat-AS Phenylalanin ist in grün hervorgehoben. Zeichnung nach [Stachelhaus *et al.*, 1999].

Die α -Amino- und α -Carboxyl-Gruppe der Substrat-Aminosäure werden jeweils durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den Seitenketten der Aminosäure-Reste Asp235 und Lys517 stabilisiert. Diese beiden Reste sind Bestandteile der hochkonservierten Core-Motive A4 (Asp235) und A10 (Lys517). Der Rest Lys517 liegt hierbei auf einem Loop der C-terminalen Untereinheit und repräsentiert damit den einzigen Konstituenten der Substrat-Bindungstasche, welcher nicht zwischen den Core-Motiven A4 und A5 lokalisiert ist. Auf der linken Seite wird die Phenylalanin-selektive Bindungstasche durch die Seitenketten von Ala236, Ile330 und Cys331 aufgebaut, während die rechte Seite aus den Resten Ala322, Ala301, Ile299 und Thr278 gebildet wird. Die Unterseite der Tasche wird durch den Rest Trp239 verschlossen, der beide Seiten der Bindungstasche durch den Seitenketten-Indol-Ring voneinander trennt.

2.7.2 Der Selektivitäts-vermittelnde Kode der NRPS A-Domänen

Neben der Phe-selektiven A-Domäne aus *B. brevis* konnte von Conti *et al.* mit der Luciferase aus Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) die Kristallstruktur eines zweiten Adenylat-bildenden Enzyms aufgeklärt werden [Conti *et al.*, 1996]. Obwohl beide Enzyme nur etwa 16% Sequenz-Homologie aufweisen, offenbarten Struktur-basierte Alignments, dass ihre Strukturen zu 67% identisch sind. Da NRPS A-Domänen üblicherweise deutlich höhere Sequenz-Homologien zwischen 26% und 56% besitzen wurde postuliert, dass alle A-Domänen eine PheA-ähnliche Faltung aufweisen und jene Reste, welche die Substrat-Bindungstasche von PheA aufspannen auch in anderen A-Domänen für die Ausbildung der Substrat-Selektivität verantwortlich sind. Durch Sequenz-Vergleich von über 160 bekannten A-Domänen unterschiedlicher Selektivität, wurden so die zehn postulierten Bindungstaschen-Konstituenten dieser strukturell bislang nicht aufgeklärten A-Domänen determiniert (siehe Abb. 2.10) [Challis *et al.*, 2000; Stachelhaus *et al.*, 1999].

Die Reduktion der Sequenz einer A-Domäne auf ihre zehn, putativen Bindungstaschen-Konstituenten führt zu einer kurzen Sequenz, die als Selektivitäts-vermittelndes Kodon dieser NRPS A-Domäne gewertet werden kann (siehe Kapitel 9.3). Der Vergleich der putativen Kodone von 160 A-Domänen zeigte zum einem, dass die Kodons in phylogenetischen Untersuchungen entsprechend der Substrat-Selektivität ihrer Ursprungs-Enzyme miteinander klustern. Zum anderen wurde beobachtet, dass die verschiedenen Positionen innerhalb einer Substrat-Bindungstasche offensichtlich eine unterschiedliche Variabilität besitzen und diesen Resten daher ein unterschiedlicher Einfluss auf die Ausbildung der Substrat-Selektivität zugesprochen werden muss [Stachelhaus *et al.*, 1999]. So sind die beiden Reste Asp235 und Lys517 nahezu invariant, da sie das gebundene Substrat offensichtlich durch die Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen mit dessen α -Amino- und α -Carboxyl-Gruppe stabilisieren. Nur eine moderate Variabilität innerhalb der 160 A-Domänen konnte an den Positionen 236, 301 und 330 (Nummerierung, bezogen auf PheA) beobachtet werden, so dass diesen Resten lediglich ein modulierender Effekt bezüglich der Vermittlung der Substrat-Selektivität zugesprochen wird. Eine hohe Variabilität wurde schließlich für die Aminosäure-Reste an den Positionen 239, 322 und 331 ermittelt, die daher höchstwahrscheinlich einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der Substrat-Selektivität ausüben

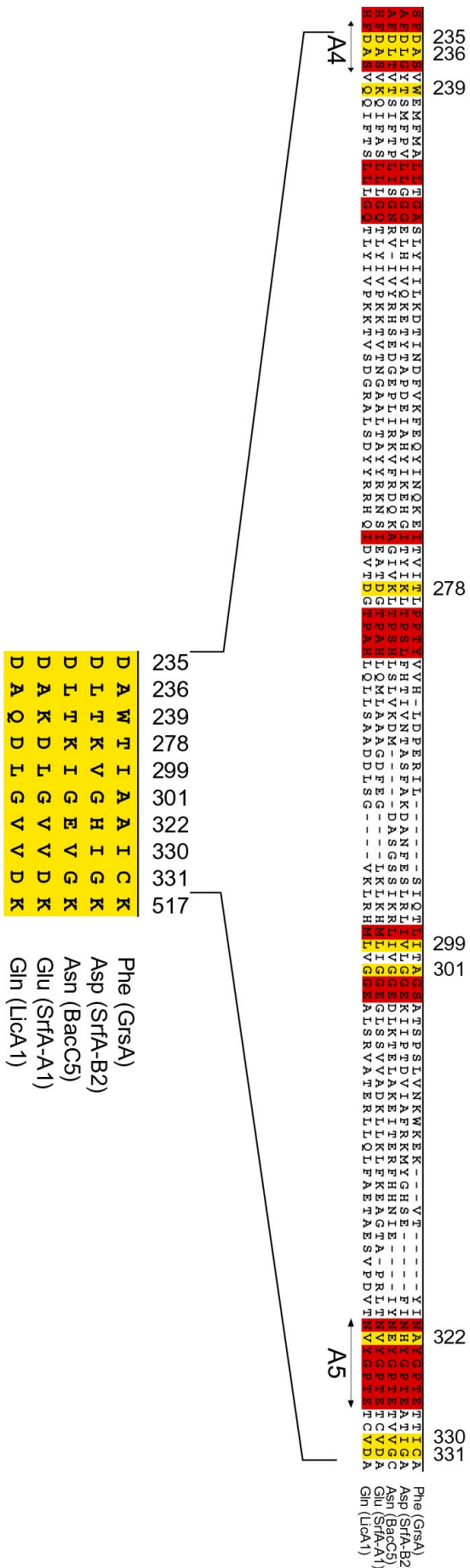


Abb. 2.10: Bestimmung der Selektivitäts-vermittelnden Reste von NRPS A-Domänen
Am Beispiel der A-Domänen Aspa (SrfA-B2), Asna (Bacc5), Glua (SrfA-A1) und Glna (LicA1) wird die Determinierung der zehn, Selektivitäts-vermittelnden Reste demonstriert. Das Alignment zeigt den Vergleich der AS-Sequenzen dieser Proteine mit der Primärstruktur von Phea im Bereich zwischen den Core-Motiven A4 und A5. Die Bindungstaschen-Konstituenten (gelb) können anhand ihrer relativen Position zu konservierten Core-Sequenzen (rot) determiniert werden, die als strukturelle Anker fungieren. Die Reduktion dieser Sequenzen auf die postulierten zehn Bindungstaschen-aufbauenden Aminosäure-Reste führt zu Sequenzen, die als Selektivitäts-vermittelnde Kodone dieser NRPS A-Domänen interpretiert werden können.

dürften. Für die beiden verbleibenden Reste an Position 278 und 299 wurde ebenfalls eine hohe Variabilität innerhalb der A-Domänen beobachtet, doch variieren diese Reste auch innerhalb von A-Domänen der gleichen Substrat-Selektivität. Ihnen wurde daher lediglich eine Art "Wobble"-Position zugesprochen.

Die Verifizierung dieser *in silico*-Untersuchungen erfolgte durch ortsgerichtete Mutagenese der Bindungstaschen-Konstituenten von PheA [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Hierbei konnte beobachtet werden, dass eine Vielzahl der konstruierten Mutanten eine veränderte bzw. erweiterte Substrat-Selektivität auswiesen. Zur Generalisierung der aufgestellten Theorie wurde weiterhin die Substrat-Selektivität der bislang strukturell nicht aufgeklärten A-Domäne AspA (SrfA-B2) durch ortsgerichtete Mutagenese verändert. Hierbei konnte durch Einführung einer einzigen Aminosäure-Substitution innerhalb der 550 Aminosäure-großen A-Domäne eine gezielte Selektivitäts-Umkehr von der kognaten Aminosäure L-Aspartat zum alternativen Substrat L-Asparagin herbeigeführt werden [Eppelmann *et al.*, 2002; Stachelhaus *et al.*, 1999].

Unter Ausnutzung des Selektivitäts-vermittelnden Kodes steht nun also eine weitere Methode für die gerichtete Manipulation von nichtribosomalen Proteintemplaten zur Verfügung. Hierbei ist es möglich, durch Einführung von Punktmutationen, eine gezielte Veränderung der Substrat-Selektivität von A-Domänen zu erhalten. Da diese Manipulation(en) auf den Austausch von einzelnen Aminosäure-Resten innerhalb der Substrat-Bindungstasche begrenzt sind, können hierdurch Störungen in der Tertiär-Struktur, sowie der inter- und intramodularen Kommunikation weitestgehend ausgeschlossen werden.

2.8 Heterologe Expression von NRPS-Genen

Die Anwendbarkeit der in 2.6 und 2.7 beschriebenen Methoden zur *in vivo*-Manipulation von nichtribosomalen Proteintemplaten erfordert die genetische Zugänglichkeit des entsprechenden Produzentenstammes. Da jedoch für eine Vielzahl der identifizierten Peptidantibiotika-Produzenten bislang keine geeigneten molekularbiologischen Methoden entwickelt wurden, stellt die heterologe Expression einen essentiellen Schritt und somit einen entscheidenden Engpass auf dem Weg zu einer kombinatorische Biosynthese neuartiger Peptidantibiotika dar.

2.8.1 Heterologe Produktion von rekombinanten Proteinen

Die ersten Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung von einzelnen NRPSs Domänen und Modulen beschränkten sich auf die Verwendung der nichtribosomalen Biosynthese-Systeme des Genus *Bacillus* [Gocht & Marahiel, 1994; Mootz & Marahiel, 1997; Stachelhaus *et al.*, 1996a; Stachelhaus & Marahiel, 1995]. Hierfür wurden die kodierenden Gen-Fragmente heterolog im Gram-negativen Wirt *E. coli* exprimiert, welcher in der Lage ist, diese rekombinanten Proteine in löslicher Form zu produzieren.

Bei der Erweiterung dieser Untersuchungen musste jedoch beobachtet werden, dass sich die Verwendung des Wirtes *E. coli* für die heterologe Expression von multimodularen NRPSs Systeme als problematisch erweisen könnte. Bei ersten Versuchen mit di- und trimodularen Systemen mussten Phänomene wie Unlöslichkeit, Instabilität und Degradation der heterolog-produzierten Enzyme beobachtet werden [Doekel *et al.*, 2002; Symmank *et al.*, 1999]. Diese Problematik lässt sich wahrscheinlich auf eine unzureichende Faltung der produzierten Enzyme im heterologen Wirt *E. coli* zurückführen. Aufgrund ihres modularen Aufbaus erfordert die heterologe Produktion funktioneller NRPSs nicht nur die korrekte Faltung der eigenständigen Domänen und Module. Wie am Beispiel der Modulaustausche gezeigt wurde, dürfte hierfür vielmehr auch die Funktionalität und Stabilität des vollständigen, multimodularen Proteintemplates von Bedeutung sein.

Besonders problematisch erweist sich die Verwendung des heterologen Wirtes *E. coli* für die Produktion von NRPSs Systemen aus Actinomyceten und filamentösen Pilzen. Hierbei musste beobachtet werden, dass selbst die heterologe Produktion von einzelnen Modulen und Domänen in *E. coli* zu unlöslichen und inaktiven Proteinen führen kann. Um die biochemische Charakterisierung dieser Systeme zu ermöglichen, erfolgte daher die heterologe Expression dieser Gene in den verwandten Wirten *Streptomyces lividans*, *Neurospora crassa* und *Aspergillus niger* [Schauwecker *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1990b]. Im Gegensatz zu *E. coli* waren diese heterologen Wirte in der Lage die Proteine in einer löslichen, funktionellen und aktiven Form zu produzieren. An diesen Beispielen lässt sich somit die vorteilhafte Verwendung eines verwandten Wirtes für die heterologe Expression von NRPS-Genen aufzeigen.

2.8.2 Posttranslationale Modifikation von NRPSs

Um die Ausbildung der vollständigen Aktivität von NRPSs zu ermöglichen, muss die posttranslationale Modifikation der PCP-Domänen mit dem Ko-Faktor Ppant erfolgen. Diese Konvertierung von der inaktiven apo- in die aktive holo-Form wird durch spezialisierte PPTasen realisiert [Lambalot, et al., 1996].

Obwohl *E. coli* über drei unterschiedliche PPTasen (AcpS, EntD und o195) verfügt musste beobachtet werden, dass NRPSs in diesem Wirt häufig in ihrer inaktiven apo-Form produziert werden [Walsh *et al.*, 1997]. Dieses Phänomen lässt sich auf die hohe Substrat-Selektivität der genannten PPTasen zurückführen, die eine effiziente Phosphopantetheinylierung von NRPS Carrier-Proteinen verhindert. Während die *E. coli* PPTase AcpS die posttranslationale Modifikation von Acyl-Carrier-Proteinen (ACPs) katalysiert, stellen NRPS apo-PCP-Domänen kein Substrat für diese PPTase dar [Lambalot *et al.*, 1996]. Im Gegensatz hierzu repräsentiert EntD die inhärente PPTase des nichtribosomalen Biosynthese-Systems für das Eisen-Siderophor Enterobactin. Durch *in vitro*-Modifikations-Experimente konnte jedoch gezeigt werden, dass diese PPTase eine strikte Substrat-Selektivität für die homologen Peptidyl- und Aryl-Carrier-Protein-(ArCP)-Domänen des Enterobactin-Systems besitzt. Für heterologe PCP-Domänen konnte hingegen nur eine unzureichende posttranslationale Modifikation durch EntD beobachtet werden [Lambalot *et al.*, 1996]. Für die putative PPTase o195 konnte bislang noch kein geeignetes Substrat ermittelt werden, und so zeigte sich dieses Protein auch als gänzlich inkompetent zur Modifikation heterolog-produzierter NRPS PCP-Domänen.

Innerhalb des Genus *Bacillus* konnten zwei PPTasen determiniert werden: ein AcpS-homologes Protein, welches für die posttranslationale Modifikation der ACPs des Primär-Stoffwechsels verantwortlich ist, sowie ein EntD-homologes Protein, welches die Carrier-Proteine des Sekundär-Stoffwechsels in die aktive holo-Form überführt. Da *Bacillus* einen prominenten Produzenten nichtribosomal-synthetisierter Sekundärmetabolite darstellt und viele Stämme mehr als ein Peptidantibiotikum produzieren, konnte für viele EntD-Homologa dieses Genus eine breite Substrat-Selektivität determiniert werden. So ist beispielsweise die PPTase des Surfactin-Biosynthese-Systems, Sfp, in der Lage, neben den sieben, homologen PCP-Domänen der Surfactin-Synthetasen auch heterologe PCP, ArCP und ACP-Domänen zu modifizieren [Lambalot *et al.*, 1996; Mootz *et al.*, 2001; Quadri *et al.*, 1998]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Sfp selbst einen AcpS-defizienten Phänotyp in *B. subtilis* und

E. coli komplementieren kann [Mootz *et al.*, 2001]. Weitere Beispiele für Sfp-homologe PPTasen mit breiter Substrat-Selektivität sind Gsp, die PPTase des Gramicidin S-Biosynthese-Systems aus *B. brevis* [Borchert *et al.*, 1994], und Bli, die PPTase des Lichenysin-Biosynthese-Systems aus *B. licheniformis* [Gaidenko & Khaikinson, 1988].

Mit diesem Wissen konnten in der Folge Ko-Expressionssysteme für NRPS-Gene mit Sfp-homologen PPTase-Genen (z. B. *gsp* und *sfp*) etabliert werden, die eine heterologe Produktion von NRPSs in ihrer aktiven holo-Form in *E. coli* ermöglichen. Als Beispiel hierfür diene die heterologe Produktion des verkürzten Initiations-Moduls des Gramicidin S-Biosynthese-Systems, PheA-PCP [Ku *et al.*, 1997]. Bei der Ko-Expression mit *gsp* konnten 80% des rekombinaten PheA-PCP Proteins in der aktiven holo-Form erhalten werden, während in Abwesenheit der PPTase nur weniger als 1% des Proteins posttranslational modifiziert wurde.

2.8.3 Rekonstitution der NRP-Biosynthese in einem heterologen Wirt

Obwohl viele Beispiele für die heterologe Expression von NRPSs-Teilsystemen beschrieben wurden, ist bislang kein Beispiel für die Rekonstitution eines vollständigen NRP-Biosynthese-Systems innerhalb eines heterologen Wirtes bekannt. Neben der bereits beschriebenen Produktion von funktionellen, posttranslational-modifizierten NRPSs würde eine solche Rekonstitution weiterhin die Bereitstellung der Substrat-Aminosäuren, den Export des gebildeten Produktes, sowie die Ausbildung eines Selbst-Resistenz-Mechanismus gegen das produzierte Peptid-antibiotikum erfordern. Alle Voraussetzungen für die Rekonstitution einer NRP-Biosynthese sind nachfolgend beispielhaft für die Bacitracin-Biosynthese (vgl. Abb. 2.5) aufgezeigt.

Neben der Inkorporation der proteinogenen Aminosäuren Asn, Asp, Cys, Glu, His, Ile, Leu, Lys und Phe erfordert die Biosynthese des zyklisch-verzweigten Dodecapeptids die Bereitstellung der nichtproteinogenen Aminosäure Orn, welche an der Position 7 des Peptidproduktes inkorporiert ist. Diese Aminosäure stellt eine Zwischenstufe des Harnstoffzykluses dar [Stryer, 1990]. Da dieser Zyklus Bestandteil des allgemeinen Stoffwechsels von L-Glutamat, L-Aspartat und verwandten Verbindungen ist und außerdem eine weite Anwendung bei der mikrobiellen Arginin-Biosynthese findet, sollte die Verfügbarkeit der nichtproteinogenen Aminosäure L-Orn für die nichtribosomale Peptidsynthese kein Problem darstellen.

Die Ausbildung eines spezifischen Resistenz-Mechanismus gegen das produzierte Antibiotikum stellt einen wichtigen und kritischen Bestandteil bei der

Rekonstitution eines NRP-Biosynthese-Systems dar. Stromabwärts des Bacitracin-Biosynthese-Genklusters konnten fünf offene Leserahmen determiniert werden, deren kodierte Proteine für die Ausbildung der Bacitracin-Resistenz verantwortlich sind (siehe Abb. 2.5) [Neumüller *et al.*, 2001]. Die detektierten Gene *bcrABC* kodieren für den Bacitracin-selektiven ABC-Transporter, welcher den aktiven Export des gebildeten Peptidantibiotikums katalysiert [Podlesek *et al.*, 2000; Podlesek *et al.*, 1995]. Die Expression der Transporter-Gene *bcrABC* steht unter der Regulation des Zwei-Komponentensystem BacRS, dessen kodierende Gene stromaufwärts von *bcrABC* lokalisiert sind [Neumüller *et al.*, 2001]. Hierbei fungiert das Regulator-Protein BacR in der Abwesenheit von Bacitracin als negativer Regulator der *bcrABC* Expression.

Bei der Rekonstitution des Bacitracin-Biosynthese-Genklusters müßte also darauf geachtet werden, dass beide Genkluster ko-exprimiert werden und die produzierten Proteine im heterologen Wirt aktiv sind. Für die Surrogaten *E. coli* und *B. subtilis* konnte die allgemeine Funktionalität des Bacitracin-selektiven ABC-Transporters BcrABC nachgewiesen werden. Hierbei führte die Expression des *bcrABC*-Genklusters zur Ausbildung einer erhöhten Bacitracin-Toleranz der genannten, heterologen Wirte [Podlesek *et al.*, 2000; Podlesek *et al.*, 1995].

Stromaufwärts des Bacitracin-Biosynthese-Genklusters konnte ein weiterer offener Leserahmen, *bacT*, lokalisiert werden, der für eine NRPS-assoziierte TypII-Thioesterase kodiert [Konz *et al.*, 1997]. Am Beispiel des Surfactin-Biosynthese-Genklusters aus *B. subtilis* ATCC 21332 konnte der positive Einfluss dieser Enzyme auf die Produktivität der nichtribosomalen Peptid-Biosynthese determiniert werden [Schneider & Marahiel, 1998].

Für eine Vielzahl von Biosynthese-Systemen konnte eine Klusterung der NRPS-Gene mit den assoziierten Genen der TypII-Thioesterase, sowie des spezifischen Transport- und Regulations-Systems aufgezeigt werden [Mootz & Marahiel, 1997; Neumüller *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1998]. Diese Organisation ermöglicht die gemeinsame Regulation der involvierten Gene und erleichtert die heterologe Expression des gesamten NRP-Biosynthese-Genklusters.

2.9 Aufgabenstellung

Die Veränderung der Substrat-Selektivität von NRPSs A-Domänen mittels ortsgerechter Mutagenese stellt eine neue Methode für die gerichtete Manipulation des nichtribosomalen Proteintemplates dar. Die bisherige Verwendung dieser Technik beschränkte sich auf einzelständige A-Domänen und deren Charakterisierung *in vitro*. Im Rahmen dieser Arbeit sollte diese Methode nun erstmals auf die Veränderung der Substrat-Selektivität von A-Domänen im Kontext vollständiger Module und Synthetasen erweitert werden. Neben der *in vitro*-Charakterisierung der konstruierten Mutanten, sollte hierbei auch die Substrat-Selektivität von A-Domänen innerhalb eines vollständigen NRP-Biosynthese-Systems verändert und die Funktionalität der konstruierten, artifiziellen Systeme anhand der Produktbildung *in vivo* analysiert werden.

Durch die genetische Unzugänglichkeit der nativen Produzentenstämme wird die gerichtete Manipulation einer Vielzahl von NRP-Biosynthese-Systemen verhindert. Zur Umgehung dieser Problematik sollte im zweiten Teil dieser Arbeit ein Expressionssystem etabliert werden, welches die Produktion von funktionellen und posttranslational modifizierten NRPSs, sowie die Rekonstitution eines vollständigen NRP-Biosynthese-Systems im heterologen Wirt ermöglicht. Ein rekombinantes NRPS-System würde im genetisch-zugänglichen Wirt anschließend für gerichtete Manipulation(en) des nichtribosomalen Proteintemplates und zum rationalen Design neuer Peptidantibiotika zur Verfügung stehen.

3 Material

3.1 Mikroorganismen

Tab. 3.1 Verwendete Mikroorganismen

Stamm	Genotyp
<i>B. licheniformis</i> ATCC 10716	Wildtyp-Stamm, Bacitracin-Produzent [Johnson <i>et al.</i> , 1945]
<i>B. licheniformis</i> AK 1	Derivat von <i>B. licheniformis</i> ATCC 10716 Φ (<i>bacB'</i> - <i>kan</i> -' <i>bacB</i>) [Konz <i>et al.</i> , 1997]
<i>B. licheniformis</i> AK20	Derivat von <i>B. licheniformis</i> ATCC 10716 Φ (<i>bacR'</i> - <i>kan</i> -' <i>bacS</i>) [Neumüller <i>et al.</i> , 2001]
<i>B. subtilis</i> AS20	Derivat von <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 Φ (<i>srfA-B1'</i> - <i>cat</i> -' <i>srfA-B3</i>) [Schneider, 1996]
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Wildtyp-Stamm, Surfactin-Produzent [Cooper <i>et al.</i> , 1981]
<i>B. subtilis</i> KE30	Derivat von <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 Φ (<i>amyE'</i> - <i>cat</i> - <i>p_{spac}</i> - <i>comS-lacI</i> -' <i>amyE</i>) (<i>yckH-comS-erm-ycxA</i>) [Eppelmann <i>et al.</i> , 2001]
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>lac</i> , F[<i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15, Tn10 (Tet ^R)] [Bullock <i>et al.</i> , 1987]
<i>E. coli</i> M15	<i>ara</i> , <i>gal</i> , <i>lac</i> , <i>mtl</i> , <i>nal</i> ^S , <i>rif</i> ^S , <i>str</i> ^S , F ⁻ [Zamenhof & Villarejo, 1972]
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	Wildtyp-Stamm, Bacitracin-sensitiv [Schleifer <i>et al.</i> , 1972]

3.2 Plasmide

3.2.1 pQE60/pQE70

Die Plasmide pQE60 und pQE70 (jeweils 3,43 kb) (Qiagen, Hilden, Deutschland) gehören zur Familie der pDS-Plasmide [Bujard *et al.*, 1987] und basieren auf dem Plasmid pDS56/RBSII [Stüber *et al.*, 1990]. Sie beinhalten das β -Lactamase-Gen und den ColE1-Replikationsursprung aus pBR322 [Scutcliffe, 1979], sowie ein optimiertes Promotor/Operator-Element, bestehend aus dem *E. coli* T5-Phagenpromotor P_{N25} [Gentz & Bujard, 1985] und zwei *lac*-Operator-Erkennungssequenzen. Eine optimale mRNA-Erkennung und -Bindung wird durch die synthetische ribosomale Bindungsstelle RBSII gewährleistet. Die Plasmide enthalten spezifische multiple Klonierungs-Bereiche (*multiple cloning sites*, MCS), welche die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Nco*I, *Bam*HI, *Bgl*II (pQE60) und *Sph*I, *Bam*HI, *Bgl*II (pQE70) enthalten. Das ATG-Startkodon, das in die Erkennungssequenzen von *Nco*I bzw. *Sph*I integriert vorliegt, befindet sich hierbei in optimalem Abstand zur synthetischen RBSII. Stromabwärts der MCSs befindet sich die Kodierungssequenz des His₆-tag, gefolgt von Translations-Stopkodonen in allen drei Leserahmen. Ergänzend ist der Transkriptionsterminator t₀ des λ -Phagen enthalten [Schwartz *et al.*, 1987].

3.2.2 pAspA(H322E)

Das Plasmid pAspA(H322E) [Stachelhaus *et al.*, 1999] ist ein pQE60-Derivat und wurde zur Konstruktion der Doppel- und Tripelmutanten des kodierten Proteins AspA verwendet. Das Plasmid beinhaltet das 1,67kb-umfassende DNA-Fragment, welches für die mutierte A-Domäne des Elongations-Moduls 5 des Surfactin-Biosynthese-Operons aus *B. subtilis* ATCC 21332 kodiert.

3.2.3 pREP4

Das Plasmid pREP4 (3,74 kb) (Qiagen, Hilden, Deutschland) trägt die Resistenz-Kassette gegen Neomycin (*neo*) und das Gen des Lac-Repressors (*lac*I). Aufgrund des enthaltenen P15A-Replikationsursprung ist es kompatibel zu ColE1-Plasmiden und kann daher als Helferplasmid gemeinsam mit pQE-Derivaten in *E. coli* repliziert werden. Hierbei kann durch die von pREP4 vermittelte, erhöhte LacI-Konzentration eine kontrolliertere Expression der in pQE-Vektoren klonierte Gene erzielt werden.

3.2.4 pBluescriptII SK(-)

Der pBluescriptII SK(-)-Vektor (2,96 kb) (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) ist ein pUC19-Derivat [Vieira & Messing, 1982] und trägt den ColE1-Replikationsursprung aus pBR322 [Scutcliffe, 1979], sowie das Ampicillin-Resistenz-vermittelnde β -Laktamase-Gen. In Anwesenheit eines Helferphagen kann vom Replikationsursprung des Bakteriophagen f1 (*f1 ori*) einzelsträngige DNA synthetisiert werden. Die MCS enthält die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *SacI*, *SacII*, *NotI*, *XbaI*, *SpeI*, *BamHI*, *SmaI*, *PstI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *Clal*, *HincII*, *Sall*, *XhoI*, *DraI*, *ApaI* und *KpnI*. Bei der Klonierung von Genen und Genfragmenten in diese MCS wird das *lacZ'*-Gen des α -Peptides der β -Galaktosidase unterbrochen, wodurch eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht wird. Darüber hinaus ist die MCS von den induzierbaren Promotoren T3 und T7 flankiert, so dass eine gezielte Expression der klonierten Gene ermöglicht wird [Altling-Mess & Short, 1989].

3.2.5 pKE18/pKE19

Die Plasmide pKE18 und pKE19 [Eppelmann *et al.*, 2001] sind Derivate des Vektors pBluescriptII SK(-) und wurden zur Konstruktion der Integrations- und Expressionsplasmide für *B. subtilis* verwendet. Die Plasmide tragen den 2,53kb-umfassenden 5' homologen Bereich *yckGH* des Surfactin-Biosynthese-Klusters aus *B. subtilis* ATCC 21332, der u. a. auch den *srfA*-Promotor und die native RBS von *srfA-A* enthält. Direkt stromabwärts wurde das Gen des Kompetenz-Regulations-Faktors ComS (ca. 0,2 kb) unter die Kontrolle des *srfA*-Promoters kloniert. Des weiteren ist in den Plasmiden der 0,94kb-umfassende 3' homologe Bereich *ycxA* des Surfactin-Biosynthese-Klusters enthalten. Die genannten 5' und 3' homologen Bereiche sind in den beiden Plasmiden durch die subklonierte Chloramphenicol-Resistenz-Kassette *cat* aus pDG268 (\rightarrow pKE18) [Antoniewski *et al.*, 1990] bzw. den selektierbaren Marker *erm* aus pDG646 (\rightarrow pKE19) [Guerout-Fleury *et al.*, 1995] voneinander getrennt.

3.2.6 p Δ TE

Das Plasmid p Δ TE [Schneider & Marahiel, 1998] ist ein pBluescriptII SK(-)-Derivat und wurde ebenfalls zur Konstruktion von Integrations- und Expressionsplasmiden für *B. subtilis* verwendet. Das Plasmid beinhaltet das 3' Ende des Surfactin-Biosynthese-Kluster (*srfA-C'-srfA-TE-ycxA*; siehe Abb. 2.7) in dem *srfA-Te*, das Gen

einer TyplI-Thioesterase, gegen den selektierbaren Marker *cat* aus pDG268 [Antoniewski *et al.*, 1990] ersetzt wurde. Die resultierenden 5' und 3' homologen Bereiche des Surfactin-Biosynthese-Klusters umfassen 1,78 kb des 3' Endes von *srfA-C*, sowie 0,94 kb des *ycxA*-Genes.

3.2.7 pDG646/pDG783

Die Vektoren pDG646 und pDG783 stammen aus einer Vektoren-Kollektion, deren Plasmide unterschiedliche Antibiotika-Resistenz-Kassetten für die Anwendung in *B. subtilis* tragen [Guerout-Fleury *et al.*, 1995]. Diese Resistenz-Kassetten werden in den Plasmiden von MCSs umgeben, welche eine einfache Isolation und Subklonierung dieser Gene erlauben.

Das Plasmid pDG646 stellt ein Derivat von pSB119 [Bouvier *et al.*, 1991] dar, welches eine Insertion der 1,60kb-umfassenden Resistenz-Kassette *erm* aus dem *Staphylococcus aureus* Plasmid pE194 trägt [Horinouchi & Weisblum, 1982]. Stromaufwärts ist die Resistenz-Kassette von den Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *HindIII*, *SphI*, *PstI*, *Sall*, *AccI*, *XbaI* und *BamHI* umgeben, während stromabwärts die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *NsiI*, *ClaI*, *BamHI*, *SmaI*, *Asp718*, *EcoRI* und *HindIII* lokalisiert sind.

Auf dem Plasmid pDG783, welches ein Derivat von pSB118 [Bouvier *et al.*, 1991] darstellt, liegt die 1,49kb-umfassende Kanamycin-Resistenz-vermittelnde Kassette *kan*, welche aus dem *Streptococcus faecalis* Plasmid pJH1 stammt [Trieu-Cuot & Courvalin, 1983]. Stromaufwärts der Resistenz-Kassette liegen die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *HindIII*, *SphI*, und *PstI*, während stromabwärts die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *HindIII*, *XbaI*, *BamHI*, *SmaI*, *Asp718*, *SacI* und *EcoRI* lokalisiert sind.

3.2.8 pNEXT33A

Das Plasmid pNEXT33A [Itaya & Tanaka, 1990] wurde bei der Ko-Transformation von *B. subtilis* eingesetzt. Das 7,66 kb pBR322-Derivat [Scutcliffe, 1979] enthält den ColE1-Replikationsursprung für *E. coli* und das Ampicillin-Resistenz-vermittelnde β -Lactamase-Gen *bla*. Das Neomycin-Phosphotransferase-Gen *neo* wird von den 5' und 3' homologen Bereichen von *metD* flankiert und vermittelt nach der Integration dieser Bereiche in das *B. subtilis*-Chromosom die Ausbildung einer Neomycin-Resistenz.

3.2.9 pCm::Tc

Das Plasmid pCm::Tc [Steinmetz & Richter, 1984] stellt ein Derivat von pIC177 dar und wurde bei der Ko-Transformation von *B. subtilis* eingesetzt. Dieses Plasmid enthält die Chloramphenicol-Resistenz-Kassette *cat* aus dem *Staphylococcus aureus* Plasmid pC194 [Horinouchi & Weisblum, 1982], welche durch die Resistenz-Kassette *tet* [Itaya, 1992], die eine Tetracyclin-Resistenz in *B. subtilis* vermittelt, unterbrochen ist. Auf dem Plasmid sind weiterhin die Replikationsursprünge ColE1 für *E. coli* aus pBR322 [Scutcliffe, 1979], sowie der *B. subtilis*-ori aus pE194 [Horinouchi & Weisblum, 1982] enthalten. Aufgrund der Anwesenheit dieser beiden Replikationsursprünge kann das Plasmid als selbst-replizierende Einheit in beiden Wirtsorganismen vorliegen.

3.3 Medien

Zur Kultivierung der verwendeten Mikroorganismen wurde 2xYT-Vollmedium [Sambrook *et al.*, 1989] oder Difco Sporulations Medium (DSM) [Nakano *et al.*, 1988] verwendet. Während Vollmedium in erster Linie bei Klonierungsexperimenten und für die Überproduktion von Proteinen eingesetzt wurde, diente DSM zur Sporulation von *Bacillus*-Stämmen. Zur Herstellung fester Nährmedien konnten in beiden Fällen vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar Nr. 1 zugesetzt werden.

2xYT Medium:	Bactotrypton	16 g/L
	Hefeextrakt	10 g/L
	NaCl	5 g/L

DSM:	Nutrient Broth	8 g/L
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	120 mg/L
	KCl	1 g/L
	NaOH	600 mg/L

Nach dem Autoklavieren wurden je 1 mL/L der folgenden Lösungen zugesetzt:

Ca(NO ₃) ₂	1 M
MnCl ₂	100 mM
FeSO ₄	1 mM

Die verwendeten Antibiotika-Zusätze, die sich aus den Beschreibungen der Plasmide und Stämme ergeben, wurden den Medien in den folgenden Endkonzentrationen zugeführt:

<i>B. licheniformis</i> :	Kanamycin 25 µg/mL
<i>B. subtilis</i> :	Chloramphenicol 5 µg/mL, Erythromycin 1 µg/mL, Kanamycin 10 µg/mL, Lincomycin 25 µg/mL, Tetracyclin 20 µg/mL
<i>E. coli</i> :	Ampicillin 100 µg/mL, Kanamycin 25 µg/mL

3.4 Chemikalien und Laborprodukte

Die Chemikalien und Laborprodukte, welche im Folgenden nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Herstellern *Merck* (Darmstadt, Deutschland), *Roth* (Karlsruhe, Deutschland) oder *Sigma* (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

Tab. 3.2: Chemikalien und Laborprodukte

Hersteller	Produkt
ABI (Forster City, USA)	<i>ABI PrismTM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit</i>
Amersham Biosciences Europe (Freiburg, Deutschland)	Nylonmembran <i>Hybond N⁺</i> , Restriktions- endonukleasen, <i>ECL-Random Prime Labeling and Detektion System</i> , DNA-modifizierende Enzyme, RNase A, Lysozym, Antibiotika, IPTG, Proteinase K
AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	Hefeextrakt, Bactotrypone, Antibiotika, IPTG
Difco (Detroit, USA)	Hefeextrakt, Bactopeptone, Nutrient Broth, Casamminosäuren
Eurogentech (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten

Hersteller	Produkt
Hartmann-Analytik (Braunschweig, Deutschland)	[³ H] und [¹⁴ C]-markierte Aminosäuren
Kodak (Rochester, USA)	Röntgenfilme <i>X-Omat AR</i> und <i>Biomax MR</i> , Entwickler <i>D19</i>
MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)	Oligonukleotide
New England Biolabs (Frankfurt a.M., Deutschland)	Restriktionsendonukleasen, konzentrierte T4- DNA-Ligase, Protein- und DNA-Marker
NEN (Köln, Deutschland)	[³² P]-Pyrophosphat
Oxoid (Wesel, Deutschland)	Schaftsblut, Agar Nr.1
Qiagen (Hilden, Deutschland)	<i>QIAquick-spin PCR Purification Kit</i> , <i>QIAEX II Gel Extraction Kit</i> , Ni ²⁺ -NTA-Agarose, <i>tip20-</i> und <i>tip100</i> -Anionenaustauschersäulen
Roche (Mannheim, Deutschland)	<i>Expand long template PCR system</i>
Sartorius (Göttingen, Deutschland)	Nitrozellulosemembran
Stratagene (Heidelberg, Deutschland)	<i>QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit</i> , <i>pBluescriptII SK(-)</i>

3.5 Geräte

Tab. 3.3: Verwendete Geräte, Hersteller und Typenbezeichnung

Gerät	Typenbezeichnung und Hersteller
Blot-Apparatur	Stratagene <i>Posiblot Pressure Blotter</i> und <i>Pressure Control Station</i>
DNA-Sequenzer	PE Applied Biosystems, <i>ABI Prism 310 Genetic Analyser</i>
Elektroporationssystem	BioRad, <i>Gene Pulser II</i>
FPLC-Säulen	Amersham Biosciences Europe, <i>Chelating-Superose-Säule HR 10/2</i> , <i>HiLoad™ 26/60 Superdex 200</i> , <i>HiLoad™ 26/10 Q-Sepharose</i> , <i>HiLoad™ 26/10 Phenyl Sepharose</i> , <i>16/75 Sephacryl™ S-500</i>
FPLC-System	Amersham Biosciences Europe, Gradienten-Programmer <i>GP-250</i> , Pumpe <i>P-500</i> , Univord Optische- und Kontrolleinheit <i>UV-1</i> , 2-Kanal-Flachbrettschreiber <i>REC-102</i> , Injektionsventil <i>V-7</i> , 3-Wege Magnetventil <i>PSV-100</i> , Fraktionssammler <i>FRAC-100</i>
HPLC-ESI-MS/MS-System	PE SCIEX, <i>API Q-STAR Pulsar</i> Massen-Spektrometer
HPLC-MS-System	Agilent HPLC-System mit DAD- und MSD-Detektor, Vakuumentgaser, quarternärer Pumpe und HP-Chemstation <i>1100 MSD Series</i>
HPLC-Säulen	Macherey & Nagel, <i>CC250/3 Nucleosil 120-3C₈-Säule</i> Amersham Biosciences Europe, <i>Sephasil™ C¹⁸</i> (120 Å Porengröße, 5 µm Partikelgröße, 250 x 4 mm (Länge x Durchmesser))
Hybridisierungsöfen	Bachofer, <i>Mini 38</i>
Luftschüttler	New Brunswick Scientific, <i>Series 25 Incubator Shaker</i>
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Dynatech, <i>MR7000</i>
Photometer	Amersham Biosciences Europe, <i>Ultrospec 3000 UV / Visible Spectrophotometer</i>

Gerät	Typenbezeichnung und Hersteller
Reinstwasseranlage	Seral, <i>Seralpur Pro 90 C</i>
Rotationsvaporator	Heidolph, <i>Laborota 4000</i> mit Pumpenstand Vacuubrand, <i>CVC-2.2</i>
Speed-Vac	Uniequip, <i>Univapo 150 H</i> , Savant, <i>Speed Vac Concentrator</i>
Szintillationszähler	Packard Instrument, <i>TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer 2100TR</i>
Thermo-Cycler	Perkin Elmer, <i>Thermal Cycler 480</i> , <i>GeneAmp PCR System 9700</i>
Ultraschallbad	Bandelin, <i>Sonorex Super RK103H</i>
UV-Inkubator	Stratagene, <i>Stratalinker UV Crolinker Model 1800</i>
Vakuumpumpe	Vacuubrand, <i>Membran-Vakuumpumpe MZ2C</i>
Wasserbad	Infors, <i>Aquatron Rundsüttelmaschine</i>
Zellaufschluß	Polytec, <i>French Pressure Cell Press SLM Amicon</i>
Zentrifugen	Beckmann, <i>Spinco L2 65 B</i> Hereaus, <i>Microfuge pico</i> , <i>Minifuge RF</i> Sorvall, <i>RC 26 Plus</i>

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

Falls nicht gesondert angegeben, wurden die molekularbiologischen Arbeiten gemäß der gängigen und etablierten Methoden und Vorschriften durchgeführt [Sambrook *et al.*, 1989] Detailliertere Beschreibungen sind u. a. in [Neumüller, 2001] zu finden.

4.1.1 Plasmid-Konstruktion

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR erfolgte unter Verwendung des "*Expand long template PCR systems*" (Roche, Mannheim, Deutschland) gemäß des Hersteller-Protokolls. Mutationen (kursiv) sowie Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenzen (unterstrichen) zur anschließenden Klonierung wurden über synthetische Oligonukleotide der Firma MWG-Biotech (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) eingeführt. Die Reinigung der PCR-Amplifikate erfolgte mit dem "*QIAquick-spin PCR purification Kit*", sowie des "*QIAEX II Gel Extraction Kits*" (Qiagen, Hilden, Deutschland), ebenfalls dem Protokoll des Herstellers folgend.

pCA_{Glu}PCP und pCA_{Glu}PCP(K239Q): Das 3,14kb-umfassende DNA-Fragment, welches für das Glutamat-selektive Elongations-Modul 1 von *srfA-A* kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden 5'CA_{Glu}PCP (*EcoRI*) 5'-CTT AGA ATT CTT AGG GGA GGT ATG ACA-3' und 3'CA_{Glu}PCP (*BamHI*) 5'-TTC TCT GTG ATC GGA TCC CTC TGC AAG-3' aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 amplifiziert. Nach dem Verdau des DNA-Fragmentes mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI*, konnte durch die Ligation des Fragmentes in den analog geschnittenen His₆-tag Expressionsvektor pQE60 (Qiagen, Hilden, Deutschland) das Plasmid pCA_{Glu}PCP erhalten werden. Hier steht das klonierte Gen-Fragment unter der natürlichen Translationskontrolle der nativen RBS, sowie des natürlichen ATG-Startkodons des *srfA-A*-Genes. Die anschließende Einführung der Punktmutation erfolgte durch ortsgerichtete Mutagenese von pCA_{Glu}PCP unter Verwendung des "*QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits*" (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) mit den Oligonukleotiden 5'CA_{Glu}PCP(K239Q) 5'-CCA CTT TGA TGC GTC AGT GCA GCA AAT CTT CGC GTC G-3' and 3'CA_{Glu}PCP(K239Q) 5'-CGA CGC

GAA GAT TTG CTG CAC TGA CGC ATC AAA GTG G-3'. Die Verifizierung der Plasmide pCA_{Glu}PCP and pCA_{Glu}PCP(K239Q) erfolgte über Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung.

pAspA(H322E, I330V), pAspA(H322E, V299I) und pAspA(H322E,V299I, I330V): Die Konstruktion der Doppel- und Tripelmutanten von AspA erfolgte über ortsgerichtete Mutagenese durch inverse PCR des Plasmids pAspA(H322E) [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Die Einführung der Mutation I330V erfolgte unter der Verwendung der Oligonukleotide 5'AspA(I330V) 5'-TAC GGG CCC ACA GAA GCA ACG GTC GGC-3' und 3'AspA(I330V) 5'-CTG TGG GCC CGT ACT CAT TGA TAA ATT CGG-3', während die Mutation V299I über die Oligonukleotide 5'AspA(V299I) 5'-AAC TTC GAA TCC TTG CGC TTG ATC ATC TTG-3' und 3'AspA (V299I) 5'-GGA TTC GAA GTT CGC ATC TTT TGC AAA ACT-3' in das DNA-Fragment eingeführt wurde. Die beiden Amplifikate wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Apal* (→ I330V) bzw. *BstBI* (→ V299I) geschnitten, gereinigt und nachfolgend intramolekular re-ligiert. Darüber hinaus wurde die eingesetzte Template-DNA, zur Vermeidung möglicher falsch-positiver Transformanten, mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* verdaut und somit aus dem Reaktionsansatz entfernt. Die erhaltenen Plasmide pAspA(H322E, I330V), pAspA(H322E, V299I) und pAspA(H322E, V299I, I330V) wurden durch Restriktionsverdau analysiert und mittels DNA-Sequenzierung verifiziert.

phomoAsp(H322E): Das 4,02kb-umfassende DNA-Fragment, welches die 5' und 3' homologen Bereiche der Aspartat-selektiven A-Domäne von *srfA-B2* enthält wurde mit den Oligonukleotiden 5'homoAsp(*ClaI*) 5'-TAA ATC GAT GGA GGC TGC CAA GG-3' und 3'homoAsp(*SpeI*) 5'-TAA ACT AGT CAG TAA ATC CGC CCA GT-3' amplifiziert. Nach dem Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *ClaI* und *SpeI*, wurde das DNA-Fragment in den analog geschnittenen Vektor pKE19 [Eppelmann *et al.*, 2001], unter der Bildung des Plasmids phomoAspA, ligiert. Unter Verwendung der internen Restriktionsendonuklease-Schnittstellen *EcoRI* und *PstI*, wurde das kodierenden DNA-Fragment der mutierten Aspartat-Bindungstasche nachfolgend aus dem Plasmid pAsp(H322E) herausgeschnitten und in den analog behandelten Vektor phomoAspA integriert. Die Integrität des resultierenden Integrations-Plasmids phomoAspA(H322E) konnte mittels DNA-Sequenzierung verifiziert werden.

pΔsrfA-A1: Das 1,86kb-umfassende DNA-Fragment, welches für den 5'-Bereich des zweiten Moduls von *srfA-A* kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden 5'*srfA-A2* (*EcoRI*) 5'-AAG CGA ATT CGC GCC AGC-3' und 3'homoGlu (*SpeI*) 5'-CAC GAC TAG TGA GTG ATT CGC-3' aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 amplifiziert. Nach dem Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *SpeI*, wurde das DNA-Fragment in den analog geschnittenen Vektor pKE19 [Eppelmann *et al.*, 2001] ligiert um das Deletionsplasmid pΔsrfA-A1 zu erhalten.

phomoGluCAPCP(K239Q): Mit den Oligonukleotiden 5'homoGlu (*EcoRI*) 5'-TGC TGA ATT CTG TAA CTC ATT GAG-3' und 3'homoGlu (*SpeI*) 5'-CAC GAC TAG TGA GTG ATT CGC-3' wurde ein 6,45kb-umfassendes DNA-Fragment aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 amplifiziert, welches aus dem 5' homologen Bereich *yckGH* und der kodierenden Region der beiden ersten Module von SrfA-A besteht. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *SpeI* terminal-modifiziert und unter der Bildung des Plasmids phomoGluCAPCP in den analog geschnittenen Vektor pΔTE [Schneider & Marahiel, 1998] ligiert. Über die internen Restriktionsendonuklease-Sequenzen *HpaI* und *SphI* wurde nachfolgend das kodierende DNA-Fragment der mutierten Glutamat-Bindungstasche aus pCA_{Glu}PCP(K239Q) herausgeschnitten und in den analog behandelten Vektor phomoGluCAPCP integriert. Dieser Schritt lieferte das Integrations-Plasmid phomoGluCAPCP(K239Q), dass durch DNA-Sequenzierung verifiziert wurde.

pSD193, pSD270, pKE151, pKE170: Das 146bp-umfassende DNA-Fragment des *E. coli* T5-Phagenpromotors P_{N25} wurde mit den Oligonukleotiden 5'T5(*NspI*) 5'-AAT ACA TGT CCT TTC GTC TTC ACC TC-3' und 3'T5(*NcoI*) 5'-TGG ACC CAT GGT AAT TTC TCC TCT-3' aus dem Plasmid pQE60 (Qiagen, Hilden, Germany) amplifiziert. Nach dem Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *NspI* und *NcoI* erfolgte die Ligation des Fragmentes in den Vektor pKE18 [Eppelmann *et al.*, 2001], welcher mit den Restriktionsendonukleasen *SphI* und *NcoI* terminal modifiziert wurde. Das erhaltene Plasmid wurde pSD181 benannt. Mit den Oligonukleotiden 5'pQE70-MCS(*NcoI*) 5'-AAA CCA TGG GCA TGC GAG GAT CCT G-3' und 3'pQE70-downHis6(*BglII*) 5'-TAT AGA TCT CTG AGG TCA TTA CTG G-3' wurde aus dem Plasmid pQE70 (Qiagen, Hilden, Germany), die 110 bp umfassende multiple Klonierungs-Region (*multiple cloning site*, MCS) amplifiziert. Nach der terminalen Modifizierung mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BglII*, wurde

das DNA-Fragment unter Bildung des Plasmids pSD185 in den mit *Nco*I- und *Bam*HI-geschnittenen Vektor pSD181 ligiert.

Die 1,49kb-umfassende Kanamycin-Resistenz-Kassette wurde mit den Oligonukleotiden 5'*kan*(*Pst*I) 5'-AAT CTG CAG AGC GAA CCA TTT GAG GTG A-3' und 3'*kan*(*Pst*I) 5'-ATA CTG CAG ATA CAA ATT CCT CGT AGG C-3' aus dem Plasmid pDG783 [Guerout-Fleury *et al.*, 1995] amplifiziert. Nach dem Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Pst*I, wurde das DNA-Fragment ungerichtet in den analog geschnittenen Vektor pSD185 ligiert, wobei das Plasmid pSD193 erhalten werden konnte.

Die Konstruktion von pSD270 erfolgte mittels inverser PCR des Plasmides pSD185 unter Verwendung der Oligonukleotide 5'*psr*fT5/*His*6(*Hpa*I) 5'-GGC TGT AAC GGA TCC GGA TCT CA-3' und 3'*psr*fT5/*His*6(*Hpa*I) 5'-AAG GTT AAC TCG CAT GCC CAT G-3'. Das 6,71kb-umfassende DNA Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease *Hpa*I terminal modifiziert und die Template-DNA anschließend durch den Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Dpn*I aus dem Reaktionsansatz entfernt. Nach Reinigung und Ligation des DNA-Fragmentes konnte das Plasmid pSD237 erhalten werden. Die Integration der Kanamycin-Resistenz-Kassette erfolgte analog zur beschriebenen Konstruktion von pSD193 und lieferte das Plasmid pSD270.

Bei der Konstruktion von pKE151 und pKE170 erfolgte die Integration alternativer MCSs in pSD270 unter der Verwendung von kurzen DNA-Fragmenten. Für die Konstruktion von pKE151 wurden die Oligonukleotide 5'MCS(*Nde*I) 5'-AAT TCA TTA AAG AGG AGA AAT TAC ATA TGG GCA TGC TTA ATT AAG-3' und 3'MCS(*Nde*I) 5'-GAT CCT TAA TTA AGC ATG CCC ATA TGT AAT TTC TCC TCT TTA ATG-3' mit T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend durch Inkubation bei 4°C miteinander annealed. Hierbei entstanden die 5' überhängenden Enden, welche üblicherweise nach dem Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Bam*HI entstehen, so dass das resultierende, doppelsträngige DNA-Fragment direkt in den analog verdauten Vektor pSD270 ligiert werden konnte. Das erhaltene Plasmid pKE151 wurde anschließend für die Konstruktion von pKE170 verwendet. Hierfür wurde das Plasmid pKE151 mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Bam*HI verdaut und anschließend mit dem DNA-Fragment, welches in analoger Weise aus den Oligonukleotiden 5'MCS(*Nhe*I) 5'-TAT GGG CAT GCG GCT AGC GG-3' und 3'MCS(*Nhe*I) 5'-GAT CCC GCT AGC

CGC ATG CCC A gebildet wurde, ligiert. Die Verifizierung der konstruierten Plasmide pSD193, pSD270, pKE151 und pKE170 erfolgte mittels DNA-Sequenzierung.

pSD197, pKE203: Das 4,93kb-umfassende DNA-Fragment, welches aus der internen Region *srfA-B-2-3* besteht und für eine dimodulare NRPS der Domänen-Organisation A-PCP-C-A-PCP kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden 5'AspLeu *srfB*(*SphI*) 5'-TAA GCA TGC TTT CAT CTG CAG AAA C-3' und 3'AspLeu *srfB*(*BamHI*) 5'-AAT GGA TCC TTC GGC ACG CTC TAC aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 amplifiziert. Nach dem Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *SphI* und *BamHI*, wurde das DNA-Fragment in den analog geschnittenen Vektor pQE70 (Qiagen, Hilden, Germany) ligiert um das Plasmid pSD142 zu erhalten.

Das 1,33kb-umfassende DNA-Fragment, welches für die C-Domäne von SrfA-A kodiert, wurde aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 unter der Verwendung der Oligonukleotide 5'*srfA1-C*(*SphI*) 5'-TAT GCA TGC AAA TAA CTT TTT ACC CTT-3' und 3'*srfA1-C*(*PstI*) 5'-ATA CTG CAG CAG AAA TCA GTG TTA ATT CA-3' amplifiziert. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *SphI* und *PstI* terminal modifiziert und in den analog geschnittenen Vektor pSD142 ligiert, um das Plasmid pSD164 zu erhalten. Das resultierende, 6,24kb-umfassende DNA-Fragment, welches für die dimodulare Hybridsynthetase der Domänenorganisation C-A-PCP-C-A-PCP kodiert, wurde mit den Restriktionsendonukleasen *SphI* und *BamHI* aus dem Plasmid pSD164 herausgeschnitten und anschließend in die analog geschnittenen Expressionsvektoren pSD193 und pKE170 ligiert. Hierbei konnten die *B. subtilis*/*E. coli* Expressionsvektoren pSD197 (Derivat von pSD193) und pKE203 (Derivat von pKE170) erhalten werden.

pKE64: Das 1,19kb-umfassende DNA-Fragment, welches die 3'Region von *bacB* enthält, wurde mit den Oligonukleotiden 5'*bacB*(*EcoRI*) 5'-TGT CGA ATT CCT CGG GAG AAT CGA T-3' und 3'*bacB*(*BamHI*) 5'-TAT GGA TCC ATC TTT CCT TTG GAT ATC TC-3' aus chromosomaler DNA von *B. licheniformis* ATCC 10716 amplifiziert. Nach terminaler Modifikation mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* wurde das DNA-Fragment in den analog geschnittenen Vektor pKE18 [Eppelmann *et al.*, 2001] ligiert, um das Plasmid pKE61 zu erhalten. Das 1,18kb-umfassende DNA-Fragment, welches die 5'Region von *bacT* enthält, wurde aus chromosomaler DNA von *B. licheniformis* unter der Verwendung der Oligonukleotide

5'*bacT*(*SphI*) 5'-TAT GCA TGC TCC TGG CGC TGA TTG-3' und 3'*bacT*(*EcoRI*) 5'-TAT GAA TTC AAG CGT CCG AAG AAG GAA-3' amplifiziert. Zur Konstruktion von pKE62 wurde das DNA-Fragment mit den Restriktionsendonukleasen *SphI* und *EcoRI* modifiziert und in den analog geschnittenen Vektor pKE61 ligiert. Die 1,49kb-umfassende Kanamycin-Resistenz-Kassette *kan* wurde mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* aus dem Plasmid pDG783 [Guerout-Fleury *et al.*, 1995] herausgeschnitten und in den analog geschnittenen Vektor pKE62 ligiert, wobei das Plasmid pKE64 erhalten werden konnte.

pKE78: Die 1,60kb-umfassende MLS-Resistenz-Kassette *erm* wurde mit den Restriktionsendonukleasen *SphI* und *EcoRI* aus dem Plasmid pDG646 [Guerout-Fleury *et al.*, 1995] herausgeschnitten und in den analog behandelten Vektor pKE64 ligiert. Im erhaltenen Vektor pKE65 kam es somit zum Austausch der Kanamycin- gegen die MLS-Resistenz-Kassette. Das 3,10kb-umfassende DNA-Fragment, welches den verlängerten 5'Bereich um *bacT* enthält, wurde mit den Oligonukleotiden 5'*homobacT*(*PstI*) 5'-TAT CTG CAG TCC TGG CGC TGA TTG-3' and 3'*homobacT*(*SphI*) 5'-TAT GCA TGC CAG CTT TTC TTC CGT TTC-3' aus chromosomaler DNA von *B. licheniformis* ATCC 10716 amplifiziert. Nach terminaler Modifikation mit den Restriktionsendonukleasen *PstI* und *SphI*, wurde das DNA-Fragment in den analog geschnittenen Vektor pΔTE [Schneider & Marahiel, 1998] ligiert, wobei das Plasmid pKE66 erhalten werden konnte. Das 3,79kb-umfassende DNA-Fragment, welches aus den Genen *erm*, *bacB'* und *ycxA* besteht, wurde mit den Restriktionsendonukleasen *SphI* und *SpeI* aus dem Plasmid pKE65 herausgeschnitten und in den analog behandelten Vektor pKE66 ligiert. Hierbei konnte das Integrationsplasmid pKE78 erhalten werden.

pKE110: Mit den Oligonukleotiden 5'*bacB1*(*PstI*) 5'-TTA CTG CAG GCA TGG AGA CAA CCT GAA-3' and 3'*bacB1*(*SphI*) 5'-TTA GCA TGC GAG CGG AAG AAA GCG-3' wurde das 2,00kb-umfassende, interne DNA-Fragment von *bacB* aus chromosomaler DNA aus *B. licheniformis* ATCC 10716 amplifiziert und mit den Restriktionsendonukleasen *PstI* und *SphI* terminal modifiziert. Zur Konstruktion des Plasmides pKE107 wurde das Fragment in den analog geschnittenen Vektor pΔTE [Schneider & Marahiel, 1998] ligiert. Das 2,26kb-umfassende DNA-Fragment, welches aus den kodierenden Genen *bcrABC* des ABC-Transporters besteht, wurde aus chromosomaler DNA von *B. licheniformis* ATCC 10716 unter Verwendung der Oligo-

nukleotide 5'*bcr*(*Eco*RI) 5'-TAT GAA TTC GCG ATC GAT GAA GTA TTG GAG-3' und 3'*bcr*(*Bam*HI) 5'-TAT GGA TCC GCA CTC GAC AGA CCG T-3' amplifiziert. Nach der terminalen Modifikation mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI, wurde das DNA-Fragment in den analog geschnittenen Vektor pKE18 [Eppelmann *et al.*, 2001] ligiert. Aus dem erhaltenen Plasmid pKE108 wurde die Chloramphenicol-Resistenz-Kassette *cat* mit den Restriktionsendonukleasen *Sph*I und *Eco*RI herausgeschnitten und durch die analog präparierte MLS-Resistenz-Kassette aus pDG646 [Guerout-Fleury *et al.*, 1995] ersetzt, wobei das Plasmid pKE109 erhalten werden konnte. Aus diesem Vektor wurde das 4,85kb-umfassende DNA-Fragment, welches aus den Genen *erm*, *bcrABC* und *ycxA* aufgebaut wird, unter der Verwendung der Restriktionsendonukleasen *Sph*I and *Spe*I herausgeschnitten und in den analog geschnittenen Vektor pKE107 ligiert. Hierbei konnte das Integrationsplasmid pKE110 erhalten werden.

4.1.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte mit der Kettenabbruch-Methode nach Sanger [Sanger *et al.*, 1977] unter der Verwendung des "*ABI PrismTM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits*" (ABI, Forster City, USA) anhand des Hersteller-Protokolls. Die Verwendung dieses Kits ist jedoch auf die Sequenzierung von PCR-Fragmenten und Plasmiden beschränkt. Zur Charakterisierung chromosomaler DNA wurden die interessierenden Fragmente mittels PCR amplifiziert und das gereinigte Produkt anschließend für die Sequenzierung verwendet. Die Analyse und Auswertung der Sequenzreaktionen erfolgte abschließend unter der Verwendung des "*ABI Prism 310 Genetic Analyser*" (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland).

4.1.3 Transformation von *B. subtilis*

B. subtilis ist in der Lage beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase DNA aufzunehmen und diese mittels homologer Rekombination in sein Chromosom zu integrieren [Dubnau, 1991]. Hierbei wird die DNA als Doppelstrang an die Zelloberfläche gebunden, bevor durch membrangebundene DNAsen der Doppelstrang-Bruch katalysiert wird und die Aufnahme der DNA in Form eines Einzelstranges erfolgen kann.

Für die Transformation der entsprechenden, kompetenten *B. subtilis*-Stämme wurde - mit leichten Modifikationen - die Methode nach Klein *et al.* verwendet [Klein

et al., 1992]. Hierfür wurden die *B. subtilis* Zellen über Nacht bei 37°C und 250 Upm in HS-Medium angezogen. Anschließend wurden 20 mL LS-Medium mit Zellen dieser Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 inokuliert und bei 30°C und 100 Upm inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,55 erfolgte die Transformation der *B. subtilis*-Zellen, wobei 1 mL Zellsuspension mit 10 ng linearisierter Plasmid- oder chromosomaler DNA versetzt und über einen Zeitraum von 2 h bei 37°C und 250 Upm inkubiert wurden. Nachfolgend wurden die Zellen auf DSM-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen ausplattiert.

10x S-Base:	(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/L
	K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	140 g/L
	KH ₂ PO ₄	60 g/L
	Natriumcitrat x 2H ₂ O	10 g/L

Nach dem Autoklavieren mit 1 mL einer 1M MgSO₄-Lösung versetzen.

HS-Medium:	10x S-Base	100 mL/L
	50% (w/v) Glukose	10 mL/L
	10% (w/v) Hefeextrakt	10 mL/L
	2% (w/v) Casamino-säuren	10 mL/L
	8% (w/v) Arginin / 0,4% (w/v) Histidin	100 mL/L
	0,5% (w/v) Tryptophan	10 mL/L
	0,3% (w/v) Phenylalanin	15 mL/L

Bei 105°C autoklavieren oder sterilfiltrieren.

LS-Medium:	10x S-Base	100 mL/L
	50% (w/v) Glukose	10 mL/L
	10% (w/v) Hefeextrakt	10 mL/L
	2% (w/v) Casamino-säuren	5 mL/L
	0,5% (w/v) Tryptophan	1 mL/L
	0,3% (w/v) Phenylalanin	1,5 mL/L
	50 mM Spermin	1 mL/L
	1 M MgCl ₂	2,5 mL/L

Direkt vor Gebrauch ansetzen und anschließend sterilfiltrieren.

Viele *Bacillus*-Transformationen in dieser Arbeit erfolgten unter Verwendung eines Kongression-Experimentes. Hierbei wird ausgenutzt, dass kompetente *B. subtilis*-Zellen bei DNA-Überschuss ($>1 \mu\text{g}$ DNA pro Transformation) in der Lage sind, mehrere DNA-Moleküle gleichzeitig aufzunehmen. So können von einer Zelle gleichzeitig zwei verschiedene Plasmide und somit zwei voneinander unabhängige genetische Marker aufgenommen werden. Auf diese Weise ist es somit möglich, einen genetischen Marker ins Chromosomen von *B. subtilis* einzuführen, auf den nicht direkt selektiert werden kann und der mit dem Verlust eines selektierbaren Markers verbunden ist. Hierzu erfolgt die gleichzeitige Transformation mit einem zweiten, unabhängigen Marker, auf dessen Integration positiv selektiert wird. Anschließend können die erhaltenen Transformanten auf den Verlust des selektierbaren Markers analysiert werden.

4.1.4 Southern-Blot-Analyse

Die Analyse von spezifischen Sequenzen innerhalb chromosomaler DNA erfolgte nach der Methode von Southern [Southern, 1975]. Für die Präparation der zu untersuchenden, chromosomalen DNA wurde die Methode nach Cox verwendet [Cox, 1968]. Um Verunreinigungen in der Präparation auszuschließen, erfolgte die Reinigung der DNA mittels Anionenaustauscher-Säulen *Qiagen-tip100*, *-tip 20* (Qiagen, Hilden, Deutschland). Für die Markierung und Detektion der spezifischen DNA-Fragmente wurde das "*ECLTMRandom prime labeling and detection-Kit*" gemäß dem Hersteller-Protokolls (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) verwendet.

4.2 Proteinchemische Methoden

Die Durchführung der proteinchemischen Methoden innerhalb dieser Arbeit erfolgten, falls nichts gesondert angegeben, anhand der gängigen Literaturvorschriften [Bennett & Scott, 1971; Bradford, 1976; Burnette, 1981; Laemmli, 1970]. Detaillierte Versuchsbeschreibungen sind zusätzlich u.a. in [Neumüller, 2001] zu finden.

4.2.1 Genexpression unter der Kontrolle des T5-Promotors

Für die Expression von Genen unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren T5-Promotors wurden 400 mL vorgewärmtes 2xYT-Medium (*E. coli*: Amp¹⁰⁰, Km²⁵; *B. subtilis*: Cm⁵, Km¹⁰) in einem Verhältnis 1:100 mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes inokuliert. Anschließend erfolgte die Inkubation dieser

Kultur bei 30°C und 250 Upm. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,8 wurde die Genexpression durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) induziert und die Kultur für weitere 2 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (5000 Upm, 10 min, 4°C) geerntet.

4.2.2 Genexpression unter der Kontrolle des σ^A -abhängigen *bacA*-Promotors

In *B. subtilis* KE320 erfolgt die Expression des *bacA*-Gens unter der Kontrolle des σ^A -abhängigen *bacA*-Promotors beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase. Für Expressions-Untersuchungen wurden 400 mL vorgewärmtes 2xYT-Medium (Cm⁵, Km¹⁰) in einem Verhältnis von 1:100 mit einer Übernachtskultur des entsprechenden *B. subtilis*-Stammes angeimpft und anschließend bei 30°C und 250 Upm inkubiert. Die Zellen wurden 2 h nach dem Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase abzentrifugiert (5000 Upm, 20 min, 4°C).

4.2.3 Aufschluss von *E. coli* Zellen

Das Zellpellet einer Expressions-Studie wurde in 8 mL Puffer HEPES Puffer A (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,8 bis 8,0) resuspendiert. Der Aufschluss der *E. coli* Zellen erfolgte anschließend unter Verwendung von zwei Kompressions-Dekompressions-Zyklen bei 4°C (*French Pressure Cell Press SLM Aminco*, Polytec, Waldbronn, Deutschland). Durch Zentrifugation (15000 Upm, 45 min, 4°C) wurde der erhaltene Rohzelleextrakt abschließend von Zelltrümmern befreit.

4.2.4 Aufschluss von *B. subtilis* Zellen

Das bei der Genexpression in *B. subtilis* erhaltene Zellpellet wurde in 5 mL Saccharose Puffer A (20% (w/v) Saccharose, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTE, 0,1% (w/v) Lysozym, pH 7,8) resuspendiert und anschließend für 45 min bei 37°C inkubiert. Der Aufschluss der resultierenden Protoplasten erfolgte anschließend durch drei Kompressions-Dekompressions-Zyklen bei 4°C (*French Pressure Cell Press SLM Aminco*, Polytec, Waldbronn, Deutschland). Durch Zentrifugation (15000 Upm, 45 min, 4°C) wurde der erhaltene Rohzelleextrakt abschließend von Zelltrümmern befreit.

4.2.5 Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen, welche über eine C-terminale His₆-tag-Fusion verfügen, erfolgte über Affinitätschromatographie. Als stationäre Phase diente hierbei

Nitrilotriacetat (NTA), welches kovalent an eine Agarose-Säulenmatrix gebunden vorliegt. NTA belegt vier der sechs Koordinationsstellen eines Ni^{2+} -Ions, mit dem die Säule beladen ist. Die zwei freien Koordinationsstellen des Ions können durch zwei Imidazolringe des Proteins belegt werden, wodurch die His₆-tag-Fusionsproteine selektiv gereinigt werden können. Nach dem Waschen der Säule kann das gebundene Protein durch einen pH- (Protonierung der Histidin-Seitenketten) oder Imidazol-Gradienten (kompetitive Verdrängung) eluiert werden.

Nach Äquilibration der Säule (Chelating-Säule *HR 10/2* gefüllt mit 1 mL Ni^{2+} -NTA-Agarose (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland)) mit HEPES Puffer A (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,8 – 8,0) wurde der Rohzelleextrakt mit einer Flussrate von 0,75 mL/min aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule wurde bei einer Flußrate von 1 mL/min über 50 min ein linearer Gradient von HEPES Puffer A auf Puffer B (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,8 – 8,0) angelegt, wobei eine Elution des Proteins beobachtet werden konnte. Die Bestimmung der Reinheit der proteinhaltigen Fraktionen, welche in 1,5mL-Fractionen gesammelt wurden, erfolgte mittels SDS-PAGE-Analyse. Anschließend wurden geeignete Fraktionen vereint und mittels Dialyse gegen Assay-Puffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, pH 7,8 – 8,0) vom Imidazol befreit. Die Bestimmung der Konzentration der Proteinlösung erfolgte abschließend unter Verwendung der Methode von Bradford [Bradford, 1976].

4.2.6 Reinigung von $\text{C}_{\text{srfA-A1}}(\text{A}_{\text{Asp}}\text{-PCP-C-A}_{\text{Leu}}\text{-PCP})_{\text{srfA-B2-3}}$ aus *B. subtilis* SD10

Für die Reinigung des rekombinanten Proteins $\text{C}_{\text{srfA-A1}}(\text{A}_{\text{Asp}}\text{-PCP-C-A}_{\text{Leu}}\text{-PCP})_{\text{srfA-B2-3}}$ wurden die klassischen Methoden zur Proteinreinigung verwendet, auf deren Theorie im Folgenden nicht weiter eingegangen werden soll.

Im ersten Schritt wurde das Protein mittels einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung gereinigt. Hierzu wurde der Rohzelleextrakt mit einer gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung auf eine Endkonzentration von 35% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt, 1,5 h bei 4°C gerührt und der Niederschlag abzentrifugiert (15000 Upm, 20 min, 4°C). Anschließend wurde der Überstand analog einer 55%igen (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung unterzogen. Das erhaltene Pellet wurde in 2 mL HEPES Puffer C (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6,5) resuspendiert und gegen 200 mL desselben Puffers für 4 h dialysiert. Die Proteinlösung wurde anschließend bei einer Flussrate von 5 mL/min auf eine mit HEPES Puffer C äquilibrierte Molekularsieb-Säule (*HiLoadTM 26/60 Superdex 200*) aufgetragen und die Proteine isokratisch eluiert. Die

Fraktionen, welche das rekombinante Protein enthielten, wurden mittels SDS-PAGE-Analyse [Laemmli, 1970] ermittelt und anschließend vereinigt. Die erhaltene Proteinprobe wurde im Folgenden auf eine mit 90% HEPES Puffer C / 10% HEPES Puffer D (50 mM HEPES, 1 M NaCl, pH 6,5) äquilibrierte Anionenaustauscher-Säule (*HiLoadTM 26/10 Q-Sepharose*) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mittels eines linearen Gradienten auf 100% HEPES Puffer D (Flussrate 0,5 mL, 50 min). Anschließend wurden die Fraktionen, welche das rekombinante Protein beinhalten, vereint und gegen das 100-fache Volumen HEPES Puffer E (50 mM HEPES, 1 M (NH₄)₂SO₄, pH 7,0) für 4 h dialysiert. Nach Zentrifugation wurde die Proteinprobe auf eine mit HEPES Puffer E äquilibrierte Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie-Säule (*HiLoadTM 26/10 Phenyl Sepharose*) mit einer Flussrate von 2mL/min aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte anschließend unter Anlegen eines linearen Gradientens (2 mL/min, 50 min) auf 100% HEPES Puffer F (50 mM HEPES, pH 7,0). Mittels SDS-PAGE-Analyse wurden die Fraktionen erneut analysiert, geeignete Proben vereint und anschließend gegen Assay-Puffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, pH 7,8–8,0) dialysiert. Die Bestimmung der Konzentration der Proteinlösung erfolgte abschließend unter Verwendung der Methode von Bradford [Bradford, 1976].

Für die beschriebene, konventionelle Proteinreinigung wurden ausschließlich Säulen der Firma Amersham Biosciences Europe (Freiburg, Deutschland) verwendet.

4.2.7 Reinigung von BacA aus *B. subtilis* KE320

In Analogie zur oben beschriebenen Reinigung der dimodularen Hybrid-synthetase erfolgte die Reinigung des BacA-Proteins zunächst ebenfalls über eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung. Das Pellet einer 35% bis 50%igen Fällung wurde in 2 mL Saccharose Puffer B (10% (w/v) Saccharose, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTE, pH 8,0) aufgenommen. Die erhaltene Lösung wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min auf eine mit Saccharose Puffer B äquilibrierte Molekularsieb-Säule (*16/75 SephacrylTM S-500* (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland)) aufgetragen, von der die Proteine anschließend isokratisch eluiert wurden. Fraktionen, welche das rekombinante Protein enthielten, wurden mittels SDS-PAGE-Analyse [Laemmli, 1970] ermittelt und anschließend vereinigt. Die Bestimmung der Konzentration der Proteinlösung erfolgte abschließend unter Verwendung der Methode von Bradford [Bradford, 1976].

4.2.8 ATP/Pyrophosphat-Austauschreaktionen

Die Selektivität von NRPSs wird durch Adenylierungs-Domänen determiniert, welche die kognaten Aminosäuren unter ATP-Verbrauch und Pyrophosphat-Abspaltung als korrespondierendes Aminoacyl-Adenylat aktivieren [Grevers *et al.*, 1968; Lee & Lipmann, 1975]. Die Reversibilität dieser Reaktion wird ausgenutzt, um die Substrat-Selektivität und die katalytischen Eigenschaften von NRPS A-Domänen zu untersuchen.

Hierbei wird eine A-Domäne mit ihren Substraten (Aminosäure, ATP und der Kofaktor Mg^{2+}) und geringen Mengen [^{32}P]-Pyrophosphat ($[^{32}P]$ -PP_i) inkubiert. Die Aktivierung der Substrat-Aminosäure führt zur Bildung des Aminoacyl-Adenylates unter der Abspaltung von PP_i. Bei der Rückreaktion kommt es anschließend, durch Inkorporation des [^{32}P]-PP_i, zur Bildung radioaktiv-markierten [^{32}P]-ATP's. Im Gegensatz zu PP_i wird das enthaltene ATP anschließend durch Adsorption an Aktivkohle gebunden und kann so selektiv aus dem Ansatz abgetrennt werden. Die Inkorporation von [^{32}P]-markierten ATP im Aktivkohle-Niederschlag steht somit in Abhängigkeit zur Aktivierung der analysierten Aminosäuren durch die zu charakterisierende A-Domäne.

Da in der ATP/PP_i-Austauschreaktion die Rückreaktion verfolgt wird, kann diese Reaktion kein direktes Maß für die Verfügbarkeit des Aminoacyl-Adenylates darstellen. Allerdings ist die Menge des gebildeten [^{32}P]-ATPs proportional zur ATP/PP_i-Austauschrate und der spezifischen Aminosäure-Aktivierung durch die zu charakterisierende A-Domäne. Die Bestimmung von Blindwerten erfolgt daher in der Abwesenheit von Aminosäure oder ATP.

In parallelen Ansätzen wurden die zu testenden Aminosäuren und Enzyme vorgelegt und mit Puffer auf 50 μ L aufgefüllt (Mix1). In einem zweiten Ansatz wurden ATP, PP_i, $MgCl_2$ und radioaktiv-markiertes [^{32}P]-PP_i vermischt und mit Puffer auf 50 μ L aufgefüllt (Mix2). Nach dem Vermischen beider Proben wurden diese für 15 min bei 37°C inkubiert, bevor durch Zugabe von 500 μ L eiskalter Terminations-Lösung die Reaktion abgestoppt wurde. Nach dem Vortexieren wurde die Aktivkohle durch Zentrifugation (13000 Upm, 1 min) pelletiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen, das Pellet in 1 mL H₂O resuspendiert und durch erneute Zentrifugation (13000 Upm, 1 min) pelletiert. Nach Wiederholung dieses Waschschrittes wurde die pelletierte Aktivkohle in 500 μ L H₂O aufgenommen und in ein mit 3,5 mL Szintillations-Flüssigkeit "*Rotiszint Eco Plus*" (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

gefülltes Szintillations-Röhrchen überführt. Die Zählraten der Proben wurden anschließend unter Verwendung des Szintillations-Zählers "*TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer 2100TR*" (Packard Instrument, Meriden, USA) vermessen.

Reaktionsmix:

Enzym	200 nM
Aminosäure	1 mM
ATP	1 mM
PP _i	50 µM
MgCl ₂	10 mM
[³² P]-PP _i	0,15 µCi
in Puffer	

Terminations-Lösung:

Natriumpyrophosphat	100 mM
Perchlorsäure	560 mM
Aktivkohle (Norit A)	1.2% (w/v)

Als Standard-Puffer für die ATP/PP_i-Austauschreaktionen wurde Assay-Puffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, pH 7,8–8,0) verwendet, während für die Charakterisierung von BacA aus *B. subtilis* KE320 Saccharose Puffer B (10% (w/v) Saccharose, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTE, pH 8,0) eingesetzt wurde.

Aufgrund der geringen Konzentration des erhaltenen Proteins BacA wurde in diesem Fall das Reaktionsvolumen auf 200 µL (Mix1: 150 µL, Mix2: 50 µL) erhöht. Um Nebenreaktionen der enthaltenen Protein-Verunreinigungen in der heterogenen Proteinprobe ausschließen zu können, wurde dATP anstelle von ATP verwendet.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der ATP-PP_i-Austauschreaktion erfolgte eine dreifache Bestimmung der Messwerte. Hierbei wurde der Mix1 für 1 min bei 37°C inkubiert, bevor der Mix2 hinzugegeben wurde. Das Abstoppen der Reaktionen erfolgte nach 1 min Inkubation bei 37°C durch Zugabe der Terminations-Lösung.

4.2.9 Beladung von NRPSs mit radioaktiv-markierten Aminosäuren

Die kovalente Beladung von NRPS PCP-Domänen mit den Substrat-Aminosäuren kann durch die Inkubation der Enzyme mit radioaktiv-markierten Aminosäuren unter Zugabe von ATP und MgCl_2 analysiert werden. Die anschließende Präzipitation des Proteins mit Trichloressigsäure (TCA) führt zur Ko-Präzipitation der gebundenen Aminosäure, während die freien Aminosäuren im Überstand verbleiben und abgetrennt werden können. Bei der Bestimmung des Blindwertes dieser Reaktion wird auf die Zugabe von ATP verzichtet.

Im ersten Ansatz wurde das zu analysierende Enzym mit MgCl_2 vorgelegt und mit Puffer auf 50 μL aufgefüllt (Mix1). Die radioaktiv-markierte Aminosäure und ATP wurden im zweiten Ansatz vorgelegt und mit Puffer auf ein Volumen von 50 μL aufgefüllt (Mix2). Nach dem Vermischen beider Ansätze wurden das Reaktionsgemisch für 15 min bei 37°C inkubiert, bevor durch Zugabe von 800 μL eiskalter, 10%iger TCA-Lösung die Reaktion abgestoppt wurde. Um eine quantitative Fällung der Proteine sicherzustellen, wurden 15 μL BSA-Lösung (25 g/L) zur Ko-Präzipitation hinzu gegeben. Nach ihrem Vortexieren wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert, bevor das Präzipitat durch Zentrifugation (13000 Upm, 30 min, 4°C) pelletiert wurde. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und das Pellet vorsichtig mit 800 μL eiskalter, 10%iger TCA-Lösung überschichtet. Nach Zentrifugation (13000 Upm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand entfernt, das Pellet auf analoge Weise ein zweites Mal gewaschen, bevor es in 400 μL Ameisensäure gelöst und in ein Szintillations-Röhrchen mit 3,5 mL Szintillations-Flüssigkeit "*Rotiszint Eco Plus*" (Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt wurde. Die Zählraten der Proben wurden anschließend unter Verwendung des Szintillations-Zählers "*TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer 2100TR*" (Packard Instrument, Meriden, USA) vermessen.

Die prozentuale Beladung des Proteins kann anschließend durch Umrechnung der erhaltenen Zählraten mit der spezifischen Aktivität der radioaktiv-markierten Aminosäure determiniert werden.

Die spezifischen Aktivitäten der eingesetzten [^3H]- und [^{14}C]-markierten Aminosäuren (Hartmann-Analytik, Braunschweig, Deutschland) waren: L-[^{14}C]-Aspartat (200 Ci/mol); L-[^{14}C]-Leucin (292 Ci/mol); L-[^{14}C]-Isoleucin (260 Ci/mol); L-[^{14}C]-Prolin (246 Ci/mol); L-[^{14}C]-Phenylalanin (450 Ci/mol).

Reaktionsmix:

Enzym	500 nM
[³ H] bzw. [¹⁴ C]-Aminosäure	1200 nM
ATP	4 mM
MgCl ₂	10 mM
in Puffer	

Als Standard-Puffer für die Beladungs-Reaktionen wurde Assay-Puffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, pH 7,8–8,0) verwendet, während für die Charakterisierung von BacA aus *B. subtilis* KE320 Saccharose Puffer B (10% (w/v) Saccharose, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTE, pH 8,0) eingesetzt wurde.

Im Falle des rekombinanten Proteins C_{srfA-A1}-(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)_{srfA-B2-3} aus *B. subtilis* SD10 wurde aufgrund der geringen Konzentration der Protein-Lösung nur 200 nM anstelle von 500 nM Enzym eingesetzt. Um Nebenreaktionen durch die enthaltenen Protein-Verunreinigungen in der heterogenen Proteinprobe ausschließen zu können, wurde dATP anstelle von ATP verwendet.

Aufgrund der geringen Konzentration des erhaltenen Proteins BacA, wurde in diesem Fall das Reaktionsvolumen auf 200 µL (Mix1: 150 µL, Mix2: 50 µL) erhöht. Des weiteren wurde dATP anstelle von ATP verwendet, um wiederum Nebenreaktivitäten der Protein-Verunreinigungen ausschließen zu können.

4.2.10 Posttranslationale Modifikation *in vitro*

Zur Bestimmung der post-translationalen Modifikation der *in vivo* produzierten NRPSs mit dem Ko-Faktor Ppant wurde untersucht, ob eine nachträgliche *in vitro*-Modifikation der PCP-Domänen unter der Katalyse der PPTase Sfp zu einer Erhöhung des Aminosäure-Einbaus führt [Lambalot *et al.*, 1996].

Hierzu wurde das zu analysierende Enzym zunächst mit MgCl₂, CoASH und Sfp vermischt, mit Puffer auf 100 µL aufgefüllt und anschließend für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der radioaktiv-markierten Aminosäure und ATP. Nach weiterer Inkubation für 15 min bei 37°C konnte die Probe - in der für Beladungs-Reaktionen beschriebenen Weise - aufgearbeitet werden (siehe Kapitel 4.2.8).

Reaktionsmix:

Enzym	500 nM
Sfp	1 nM
CoASH	100 μ M
MgCl ₂	10 mM
[³ H] bzw. [¹⁴ C]-Aminosäure	1200 nM
ATP	4 mM
in Puffer	

Im Falle des rekombinanten Proteins $C_{srfA-A1}-(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)_{srfA-B2-3}$ aus *B. subtilis* SD10 wurde aufgrund der geringen Konzentration der Protein-Lösung nur 200 nM anstelle von 500 nM Enzym eingesetzt. Um Nebenreaktivitäten der enthaltenen Protein-Verunreinigungen in der heterogenen Proteinprobe ausschließen zu können, wurde dATP anstelle von ATP verwendet.

4.3 Analytische Methoden

4.3.1 Surfactin-Präparation

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Surfactin-Präparation beruht auf dem Verfahren von Nakano [Nakano *et al.*, 1988]. Hierbei wurden 400 mL vorgewärmtes SpIII Medium (SpII Medium ohne KCl [Cutting & Vander Horn, 1990]) in einem Verhältnis von 1:100 mit einer Übernachtskultur des entsprechenden *B. subtilis*-Stammes angeimpft und anschließend für 12 bis 72 h bei 37°C und 250 Upm inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand zweimal für je 1 h unter Schütteln mit 200 mL n-Butanol extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend am Rotationsvaporator bis zur Trockene eingengt, bevor der erhaltene Rückstand in 5 mL Methanol aufgenommen wurde.

10x T-Base:	(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/L
	K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	183 g/L
	KH ₂ PO ₄	60 g/L
	Natriumcitrat x 2H ₂ O	10 g/L

SpIII-Medium:	10x T-Base	100 mL/L
	50% (w/v) Glukose	10 mL/L
	1,2 % (w/v) MgSO ₄	70 mL/L
	10% (w/v) Hefeextrakt	10 mL/L
	2% (w/v) Casaminosäuren	5 mL/L

Vor Gebrauch frisch ansetzen und sterilfiltrieren.

4.3.2 Surfactin-Analyse unter Verwendung von Blutagarplatten

Die hämolytische Aktivität der präparierten Surfactine wurde unter Verwendung von Blutagarplatten analysiert. Das Glucose-Minimalmedium enthält Erythrocyten, welche durch die Oberflächenreduzierende-Aktivität des Surfactins lysiert werden [Arima *et al.*, 1968; Nakano *et al.*, 1988]. Hierdurch kommt es zur Ausbildung von hellen, durchsichtigen Zonen (sogenannten Halos) im ansonsten trüben, roten Blutagar-Medium.

Zur Herstellung der Blutagarplatten wurden eine sterile 1,5%ige Agarlösung aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit den weiteren Zutaten versetzt. Unter stetigem Schwenken des Kolbens wurde das Schafsblut hinzugegeben und die Platten anschließend zügig gegossen. Eine übermäßige Schaumbildung musste hierbei vermieden werden, da Luftblasen zu hellen Flecken auf der Agarplatte führen würden.

Auf die Blutagarplatten wurden sterile 3MM-Whatman-Papiere (Ø 5 mm) positioniert, auf denen ca. 10 µL der methanolischen Surfactin-Lösungen aufgetragen wurden. Nach Inkubation der Platten für ca. 30 h bei 37°C konnte die Ausbildung von Lyse-Höfen beobachtet werden.

Agarlösung:	Agar Nr. 1	15 g/L
--------------------	------------	--------

Blutagarplatten:	Agarlösung	800 mL
	10x T-Base	100 mL
	50% (w/v) Glukose	10 mL
	1,2 % (w/v) MgSO ₄	10 mL
	10,5 % (w/v) Natriumglutamat	1 mL
	Schafsblut	80 mL

4.3.3 Surfactin-Analyse mittels HPLC/MS

Die Charakterisierung der produzierten Surfactin-Derivate in den präparierten Extrakten erfolgte anhand eines HPLC/MS-Systems (*1100 MSD Series*, Agilent, Waldbronn, Deutschland) unter der Verwendung einer *Reversed-Phase*-Säule (*CC250/3 Nucleosil 120-3C₈-Säule*, Macherey & Nagel, Düren, Deutschland).

Das Prinzip dieses Verfahrens zur Trennung von Substanzgemischen beruht auf den unterschiedlichen hydrophoben Wechselwirkungen der Analyten mit der Matrix. Im verwendeten *Reversed-Phase* Modus dient chemisch modifiziertes Kieselgel als stationäre, hydrophobe Phase, auf dessen Oberfläche C₈-Gruppen kovalent gebunden sind. Eine polare Flüssigkeit, in diesem Falle ein angesäuertes H₂O / Methanol-Gemisch, stellt die mobile Phase dar. Beim Anlegen des linearen Gradientens wird im Laufe einer Trennung der Anteil der unpolaren Komponente (Methanol) in der mobilen Phase kontinuierlich erhöht, so dass es zur schrittweisen Elution der über hydrophobe Wechselwirkungen gebundenen Substrate kommt.

Zur Analyse wurden standardmäßig 10 µL Probe auf die mit 70% HPLC-Puffer B (HPLC-Puffer A: 0,05% (w/v) Ameisensäure in H₂O; HPLC-Puffer B: 0,045% (w/v) Ameisensäure in Methanol) äquilibrierte Säule injiziert, wobei eine 1:10 Verdünnung der Extrakte aus *B. subtilis* ATCC 21332 und KE160 eingesetzt wurde. Eine Auftrennung der Proben konnte unter der Verwendung eines linearen Gradienten auf 100 % HPLC-Puffer B (30 min, Flussrate 0,3 mL/min) erreicht werden. Die Detektion der aufgetrennten Substanzen erfolgte unter der Verwendung eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 214 nm, sowie mittels eines Massen-Detektors im Positiven-Ionen-Modus über einen Massenbereich von 900 bis 1200 m/z.

4.3.4 Surfactin-Analyse mittels fragmentierender Massenspektrometrie (ESI-MS/MS)

Die Sequenzierung der generierten Surfactin-Derivate und damit auch die Verifizierung der Asp- zu Asn-Substitution an Position 5 des neuen Lipoheptapeptides [Asn⁵]-Surfactin erfolgte mit Hilfe einer fragmentierenden Massenspektrometrie an einem *API Q-STAR Pulsar* Massen-Spektrometer (PE SCIEX, Foster City, USA) mit Elektrospray-Ionisations-(ESI)-Quelle.

Bei der Verwendung einer solchen ESI-Quelle durchqueren die generierten Ionen systembedingt eine Zone im Interface-Bereich, in der sie den heißen Stickstoff-Molekülen des Curtain-Gases und den Lösungsmittel-Molekülen des

Desolvatisierungsprozesses ausgesetzt sind. In der Regel führt dieser Zustand zu keinem Zerfall der Ionen, doch kann eine Fragmentierung durch die Erhöhung der Skimmer-Spannung, welche die kinetische Energie der Ionen erhöht, induziert werden. Eine analoge Fragmentierung ist auch in der Ionenfalle mit Hilfe des dort befindlichen Helium-Gases möglich. Für eine Fragmentierung kann dort das interessierende Ion äußerst selektiv - selbst auf distinkte Isotopomere genau - isoliert werden. Die isolierten Ionen können nun durch Anlegen einer Fragmentor-Spannung resonant angeregt werden. Bei der resultierenden Kollision mit den Helium-Atomen nehmen die Ionen dabei soviel innere Energie auf, dass sie schließlich fragmentieren. Dieser Prozess ist durch Variation der Dauer und Amplitude der Anregung sehr gut kontrollierbar. Peptidische Ionen zerfallen nach Kollisionsaktivierung bevorzugt zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff und Amid-Stickstoff einer Peptidkette. Hierbei entstehen ein N-terminales b- und ein C-terminales y-Fragment, sowie - bei der Sequenzierung eines Peptides - vollständige, komplementäre b- und y-Serien. Die Fragmente werden anschließend aus der Kollisionszelle entlassen und können nachfolgend detektiert werden.

Die ESI-MS/MS-Experimente wurden im positiven Ionen-Modus mit einer Ionisations-Spannung von 5 kV durchgeführt. Für die Fragmentierung wurde das jeweils prominenteste [M+K] Ion des C₁₄-Derivates ([Asp⁵]-Surfactin = 1074,63 m/z; [Asn⁵]-Surfactin = 1073,68 m/z) ausgewählt und in der Kollisionszelle mit einer Energie von 80 kV fragmentiert. Die detektierten b- und y-Ionen-Serien konnten anschließend mit der Software-Komponente *BioAnalyst* des *AnaLystQS*-Programmpaketes ausgewertet und analysiert werden.

4.3.5 Bacitracin-Präparation

Da der konstruierte *B. subtilis*-Stamm KE360 nicht in der Lage ist im bekannten Bacitracin-Produktionsmedium M20 [Haavik & Froyshov, 1975] zu wachsen, musste ein neues Produktionsmedium für die Bacitracin-Präparation determiniert werden. Hierfür erfolgte die quantitative Analyse der Bacitracin-Produktion von *B. subtilis* KE360 und *B. licheniformis* ATCC 10716 in DSM und 2xYT-Medium.

Zur Präparation des produzierten Bacitracin-Komplexes wurden 4 mL Medium mit Zellen des entsprechenden *Bacillus*-Stammes inokuliert und über Nacht bei 37°C und 250 Upm inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und 1 mL des Überstandes zweimal für 1 h mit 500 µL n-Butanol unter Schütteln extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und anschließend am Rotationsvaporator bis zur Trockene

eingengt, bevor der erhaltene Niederschlag in 50 µL sterilem H₂O aufgenommen wurde.

4.3.6 Mikrobiologische Bacitracin-Analyse

Zur mikrobiologischen Bacitracin-Analyse wurde die Methode nach Hoff *et al.* verwendet [Hoff *et al.*, 1947]. In diesem Test wird die antibiotische Aktivität von Bacitracin gegen Gram-positive Mikroorganismen, in diesem Fall *Micrococcus luteus* ATCC 10240, ausgenutzt. Durch Hemmung des Wachstums der Zellen, kommt es bei der Verwendung der *M. luteus* Overlay-Platten zur Ausbildung von Hemmhöfen innerhalb der Bakterien-Kultur.

Zur Herstellung der *M. luteus* Overlay-Platten [Rieder *et al.*, 1975] wurden im ersten Schritt Agarplatten aus Medium II gegossen. Anschließend wurde ein 50mL-Aliquot Medium III aufgekocht, auf ca. 48°C abgekühlt und mit 40 µL einer *M. luteus* Übernachtskultur inokuliert. Anschließend wurden je 4 mL dieser Zellsuspension auf vorgewärmte Medium II Agarplatten verteilt, wobei die Bildung von Luftblasen vermieden wurde. Nach dem Erstarren der Platten konnten diese bis zur Verwendung für ca. 4 d bei 4 °C gelagert werden.

Auf die *M. luteus* Overlay-Platten wurden sterile 3MM-Whatman-Papiere (Ø 5 mm) positioniert auf denen ca. 10 µL der wässrigen Bacitracin-Lösungen aufgetragen wurden. Nach Inkubation des Platten bei 37°C konnte über Nacht die Ausbildung von Hemm-Höfen beobachtet werden.

Anhand einer Verdünnungsreihe des kommerziell erhältlichen Bacitracin-Standards erfolgte die Aufnahme einer Eichkurve (bezogen auf den Durchmesser der gebildeten Hemm-Höfe), anhand derer eine quantitative Bestimmung der Bacitracin-Produktion erfolgen konnte.

Medium I:	Nutrient Broth	4 g/L
	Hefeextrakt	3 g/L
	Bactopepton	3 g/L
	Glukose	1 g/L

Medium II:	Nutrient Broth	4 g/L
	Hefeextrakt	3 g/L
	Bactopepton	3 g/L
	Agar Nr. 1	15 g/L

Für 20 min bei 121°C autoklavieren

Medium III:	Medium I	50 mL
	Casaminosäuren	0,2 g
	Agar Nr. 1	750 mg

Für 15 min bei 105°C autoklavieren

Nach dem Abkühlen auf 48°C mit 40 µL einer *M. luteus* Übernachtskultur versetzen.

4.3.7 Bacitracin-Analyse mittels HPLC/MS

Die qualitative Analyse der produzierten Bacitracin-Komplexe erfolgte, analog zur qualitativen Surfactin-Analyse, unter der Verwendung eines HPLC/MS-Systems (1100 MSD Series, Agilent, Waldbronn, Deutschland) mittels einer *Reversed-Phase Sephasil TM C¹⁸*-Säule (120 Å Porengröße, 5 µm Partikelgröße, 250 x 4 mm (Länge x Durchmesser), Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland). Die Detektion der aufgetrennten Substanzen erfolgte mittels eines UV-Detektors bei den Wellenlängen 214 nm (für Peptidbindungen) und bei 252 nm (für den Thiazolinring), sowie über einen Massen-Detektor im Positiven-Ionen-Modus im Massenbereich von 600 – 1600 m/z.

Zur Trennung der Substanzen erfolgte bei einer Flussrate von 0,2 mL/min. Zunächst wurden 10 µL Probe auf die mit 25% HPLC-Puffer D (HPLC-Puffer C: 0,01% (w/v) Trifluoressigsäure in H₂O; HPLC-Puffer D: Acetonitril) äquilibrierte Säule injiziert, bevor ein linearer Gradient über 60 min auf 50% HPLC-Puffer D angelegt wurde. Abschließend wurde die Konzentration an HPLC-Puffer D innerhalb von 5 min auf 100% erhöht.

5 Ergebnisse I: Gezielte Veränderung der Substrat-Selektivität von Adenylierungs-(A)-Domänen durch ortsgerichtete Mutagenese

5.1 Strategie

Bei der nichtribosomalen Peptidsynthese wird die Primärstruktur, Größe und Komplexität des Produktes durch die Anzahl und Organisation von sich wiederholenden Modulen und Domänen innerhalb des Proteintemplates, den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPSs), bestimmt. Aufgrund dieses modularen Aufbaus ist es durch Austausch, Deletion oder Insertion von einzelnen Domänen oder ganzen Modulen innerhalb einer NRPS möglich, gezielte Veränderungen in dem zugehörigen Peptidprodukt zu erzeugen. Diese, durch genetische Manipulation hervorgerufenen Veränderungen stellen jedoch einen enormen Eingriff in die strukturelle Integrität des Proteintemplates dar. So muss z. B. beim Austausch eines vollständigen Moduls (C-A-PCP) ein Proteinfragment von ca. 120 kDa ersetzt werden. Derartig massive Eingriffe können Störungen in der intramolekularen Kommunikation, sowie in der Tertiärstruktur hervorrufen und führen letztlich zu einer erniedrigten Produktbildung.

Eine mögliche Umgehung dieses Problems wurde nach Aufklärung der Kristallstruktur der Phenylalanin-aktivierenden A-Domäne PheA des Gramicidin S Biosynthese-Genklusters aus *B. brevis* sichtbar, auf deren Grundlage die strukturelle Basis der Substraterkennung und -aktivierung von NRPS A-Domänen determiniert werden konnte [Conti *et al.*, 1997]. Die Substrat-Bindungstasche dieser 55 kDa-großen A-Domäne wird von nur zehn Aminosäure-Resten aufgebaut. Durch Sequenzvergleiche mit 160 weiteren A-Domänen unterschiedlichster Substrat-Selektivität wurde die Determinierung des Selektivitäts-vermittelnden Kodes für NRPSs ermöglicht [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Eine Verifizierung dieser *in silico*-Untersuchungen erfolgte durch gezielte Mutagenese der Selektivitäts-vermittelnden Aminosäure-Reste innerhalb der PheA-Bindungstasche, wodurch eine Relaxierung bzw. Veränderung der Substrat-Selektivität von PheA erreicht werden konnte. Weiterhin war es möglich, durch gezielte Variation einer Aminosäure die Substrat-Selektivität der bislang strukturell nicht-aufgeklärten A-Domäne AspA von dessen kognater Aminosäure L-Asp zum verwandten Seitenkettenamid L-Asn zu verändern. Hierbei wurde jedoch ein

Verlust der katalytischen Effizienz beobachtet [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Da sich die putativen Bindungstaschen von Asp- und Asn-aktivierenden Domänen in mindestens drei Positionen unterscheiden, sollte in dieser Arbeit zunächst untersucht werden, ob die katalytische Aktivität durch Einführung weiterer Mutationen wiederhergestellt werden kann.

Darüber hinaus war die Veränderung der Substrat-Selektivität von A-Domänen durch ortsgerichtete Mutagenese der Bindungstasche-aufbauenden Aminosäure-Reste bislang auf einzelständige A-Domänen limitiert. In dieser Arbeit sollte nun weiterhin versucht werden, diese Methode auf A-Domänen im Kontext kompletter Module bzw. vollständiger NRP-Biosynthese-Systeme *in vitro* und *in vivo* zu erweitern.

5.2 Veränderung der Substrat-Selektivität der einzelständigen A-Domäne AspA (SrfA-B2)

Am Beispiel der einzelständigen A-Domäne AspA des fünften Moduls des Surfactin-Biosynthese-Genclusters aus *B. subtilis* ATCC 21332 [Cosmina *et al.*, 1993] sollte die gezielte Veränderung der Selektivität für die kognate Aminosäure L-Asp zum entsprechenden Seitenkettenamid L-Asn aufgezeigt werden. Entsprechend den Vorhersagen des Selektivitäts-vermittelnden Codes unterscheidet sich die L-Asp-spezifische Bindungstasche von SrfA-B2 an drei Aminosäure-Positionen von L-Asn spezifischen A-Domänen, wie z. B. im fünften Modul der Bacitracin Synthetase C (siehe Abb. 5.1) [Konz *et al.*, 1997].

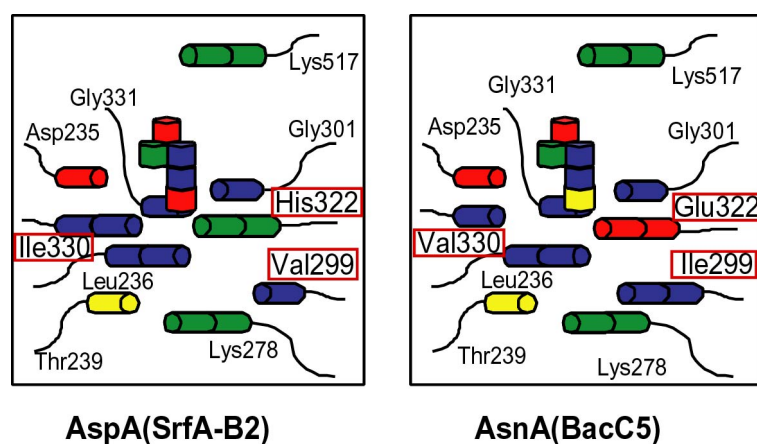


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der putativen L-Asp- (SrfA-B2) und L-Asn- (BacC5) selektiven Bindungstaschen basierend auf der Kristallstruktur von PheA

Die beteiligten aliphatischen (blau), polaren (gelb), sauren (rot) und basischen (grün) Seitenketten sind schematisch dargestellt. Die variierenden Aminosäuren an Position 299, 322 und 330 sind in rot hervorgehoben.

Während den Positionen Val299 (gegen Ile) und Ile330 (gegen Val) nur ein modulierender Effekt bezüglich der Selektivität und Effizienz der A-Domäne zugeprochen wird, handelt es sich bei dem hochvariablen Rest His322 (gegen Glu) um

die Schlüsselposition für die Veränderung der Substrat-Selektivität [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Während die basische Aminosäure His322 in der Bindungstasche von SrfA-B2 zu einer elektrostatischen Stabilisierung des sauren Substrates L-Asp führt, kommt es in BacC5 zu polaren Wechselwirkungen zwischen der Carboxyl-Gruppe von Glu322 und dem verwandten Seitenkettenamid L-Asn. Dr. Torsten Stachelhaus war bereits in der Lage, die Substrat-Selektivität der Aspartat-aktivierenden A-Domäne AspA durch Einführung der Einzelmutation His322→Glu in Richtung L-Asn zu verändern [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Obwohl die Einzelmutante AspA(His322→Glu) eine hohe Selektivität für das alternative Substrat L-Asn aufzeigte, wurde jedoch eine um den Faktor zehn erniedrigte katalytische Effizienz beobachtet. Um den Einfluss der Reste an Position 299 und 330 auf die katalytische Aktivität zu untersuchen, sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit die vollständige Adaption der Substrat-Bindungstasche von AspA an die Asparagin-selektive Bindungstasche von BacC5 durchgeführt werden.

5.2.1 Konstruktion und Überproduktion von AspA*

Durch die Verwendung von ortsgerichteter Mutagenese wurden ausgehend von dem Expressionsplasmid der Einzelmutante pAspA(H322E), die Expressionsplasmide der Doppelmutanten pAspA(H322E, I330V) und pAspA(H322E, V299I), sowie der Tripelmutante pAspA(H322E, V299I, I330V) generiert. Die Verifizierung der erhaltenen Plasmide erfolgte mittels Restriktionsverdau sowie DNA-Sequenzierung.

Da die kodierenden DNA-Fragmente in dem His₆-tag-Expressionsvektor pQE60 vorlagen, erfolgte die Reinigung des Wildtyp-Proteins, sowie der vier Mutanten nach heterologer Produktion in *E. coli* M15[pREP4] mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie. In Abb. 5.2 ist exemplarisch die heterologe Produktion und Anreicherung des Wildtyp-Proteins AspA, sowie der Einzelmutante AspA(His322→Glu) und der Doppelmutante AspA(His322→Glu, Ile330→Val) dargestellt. In allen drei Fällen sind nach IPTG-Induktion zwei Proteinbanden bei ca. 60 kDa und ca. 58 kDa zu erkennen, die beide mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie angereinigt werden. Anhand von Sequenzanalysen konnte ein interner Initiationsstartpunkt (RBS und ATG-Startkodon) gefunden werden, dessen ATG-Startkodon *in frame* mit dem nativen Strukturgen *aspA* liegt (siehe Abb. 5.3). Hierdurch kommt es in allen Konstrukten (Wildtyp und Mutanten) neben der Überproduktion der vollständigen A-Domäne AspA (556 Aminosäuren, 60,6 kDa) zur Produktion einer um 26 Aminosäuren verkürzten Deletionsmutante AspA_{kurz} (531

Aminosäuren, 57,8 kDa). Da beide Proteine eine C-terminale His₆-Tag-Fusion beinhalten und eine ähnliche Größe besitzen, war die Trennung nicht möglich.

Der Startpunkt dieser Verkürzungs-Mutante liegt hierbei bereits innerhalb der N-terminalen Region des verzerrten β -barrels, welches den Grundkörper der großen Untereinheit des A-Domäne ausbildet [Conti *et al.*, 1997]. Demzufolge ist von einer Inaktivität des verkürzten Proteins AspA_{kurz} auszugehen.

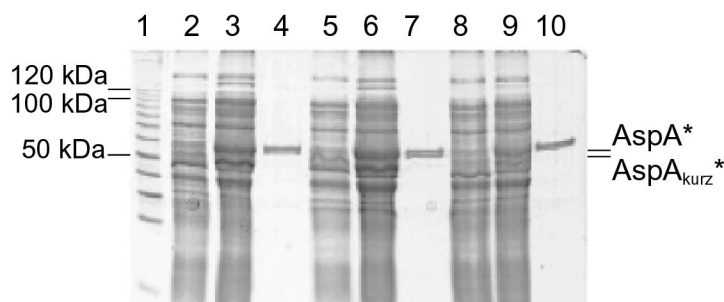


Abb. 5.2: Heterologe Expression und Reinigung von AspA*

Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, welches beispielhaft die Produktion und Reinigung der Proteine AspA (Bahn 2-4), AspA(His322→Glu) (Bahn 5-7) und AspA(His322→Glu, Ile330→Val) (Bahn 8-10) in *E. coli* M15[pREP4] aufzeigt. In Bahn 1 ist der Proteinmarker, in den Spuren 2, 5 und 8 die Gesamtzellextrakte vor Induktion, in den Spuren 3, 6 und 9 die Gesamtzellextrakte nach 2h Induktion und in den Spuren 4, 7 und 10 die gereinigten Proteine nach Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gezeigt.



Abb. 5.3: Sequenzanalyse von pQE60-aspA

Gezeigt ist die DNA- und Protein-Sequenz ausgehend vom nativen Initiationsstartpunkt bis zum internen Startkodon an der Aminosäure-Position 26. Die postulierten ribosomalen Bindungsstellen, sowie die Startkodons sind farblich hervorgehoben (rot: nativ, blau: intern).

5.2.2 Substrat-Selektivität von AspA*

Um die Substrat-Selektivität des Wildtyp-Proteins AspA, sowie der vier Mutanten (AspA(His322→Glu), AspA(His322→Glu, Ile330→Val), AspA(His322→Glu, Val299→Ile) und AspA(His322→Glu, Val299→Ile, Ile330→Val) zu bestimmen, wurden Aminosäure-abhängige ATP/Pyrophosphat-Austauschreaktionen durchgeführt (siehe Abb. 5.4). Aufgrund der SDS-PAGE-Analyse der gereinigten Protein-pools wurde angenommen, dass das aktive Protein AspA* und die inaktive Deletionsmutante AspA_{kurz}* in etwa dem gleichen Mengenverhältnis vorliegen. Daher wurden in den biochemischen Assays anstatt 20 pmol Protein 40 pmol des Proteingemisches für die jeweiligen ATP/Pyrophosphat-Austauschreaktionen eingesetzt.

Für das Wildtyp-Protein AspA konnte eine spezifische Aktivierung der Substrat-Aminosäure L-Asp gezeigt werden, wohingegen nur eine schwache Aktivierung (7%) für das verwandte Seitenkettenamid L-Asn zu beobachten war. Bei der biochemischen Charakterisierung der vier Mutanten (Einzel-, Doppel- sowie Tripelmutanten) war jedoch nur eine schwache Aktivierung (1 - 4%) des nativen Substrates L-Asp zu beobachten. Dafür zeigten alle vier Mutanten eine spezifische Aktivierung des verwandten Seitenkettenamids L-Asn. Nebenspezifitäten für die mis-kognaten Aminosäuren L-Leu und L-Phe konnten für keines der getesteten Proteine beobachtet werden.

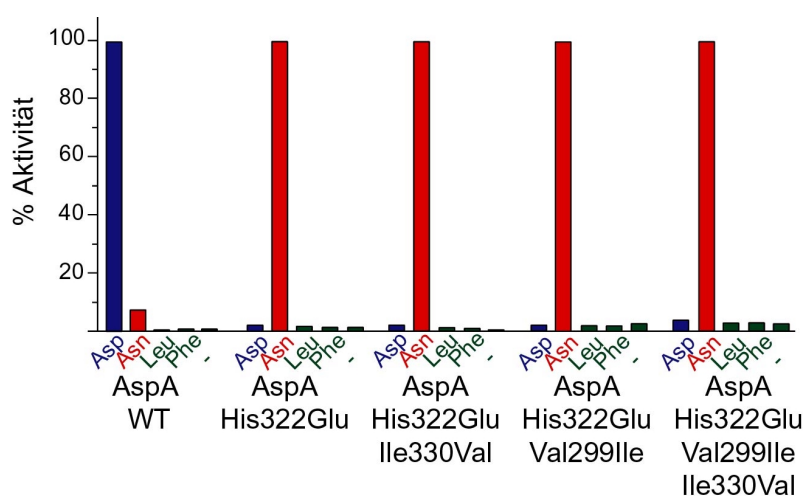


Abb. 5.4: Bestimmung der Substrat-Selektivität von AspA*

Biochemische Charakterisierung des gereinigten AspA Wildtyp-Proteins, sowie der Einzel-, Doppel-, und Tripelmutanten mittels ATP/PP_i-Austausches. Die höchste Austauschrate des entsprechenden Proteins wurde auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse der Reaktionen mit dem nativen Substrat L-Asp sind in blau, mit dem verwandten Seitenkettenamid L-Asn in rot und die Kontrollen mit den mis-kognaten Aminosäuren L-Leu und L-Phe, sowie ohne ATP(-) in grün gezeigt.

5.2.3 Katalytische Effizienz von AspA*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Einführung der weiteren Mutationen Val299→Ile sowie Ile330→Val in die Einzelmutante AspA(His322→Glu) zu keiner Veränderung der Selektivität L-Asn führten, sollte untersucht werden, ob durch die weitere Adaptation der Substrat-Bindungstasche für das alternative Substrat eine Erhöhung der katalytischen Aktivität erzielt werden konnte (siehe Abb. 5.5).

Bei den kinetischen Untersuchungen konnte für das Wildtyp-Protein AspA eine katalytische Effizienz von $k_{\text{cat}}/K_M = 2 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ für die Aktivierung des nativen Substrates L-Asp ermittelt werden. Bei allen vier AspA*-Mutanten (Einzel-, Doppel- und Tripelmutante) wurde dagegen eine um den Faktor zehn verringerte Aktivität

($k_{\text{cat}}/K_M \cong 0,22 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$) für die Aktivierung des alternativen Substrates L-Asn beobachtet. Obwohl die Bindungstasche von AspA in der Tripelmutante AspA(His322→Glu, Val299→Ile, Ile330→Val) vollständig an das Aussehen der Asparagin-selektiven A-Domänen adaptiert wurde, konnte hierdurch jedoch keine Erhöhung der katalytischen Effizienz gegenüber der Einzel- und Doppelmutanten erreicht werden. Es scheint daher plausibel, dass die postulierten zehn Aminosäure-Konstituenten der Bindungstasche zwar für die Selektivität der A-Domäne zuständig sind, jedoch weitere Faktoren deren katalytische Aktivität zu beeinflussen scheinen.

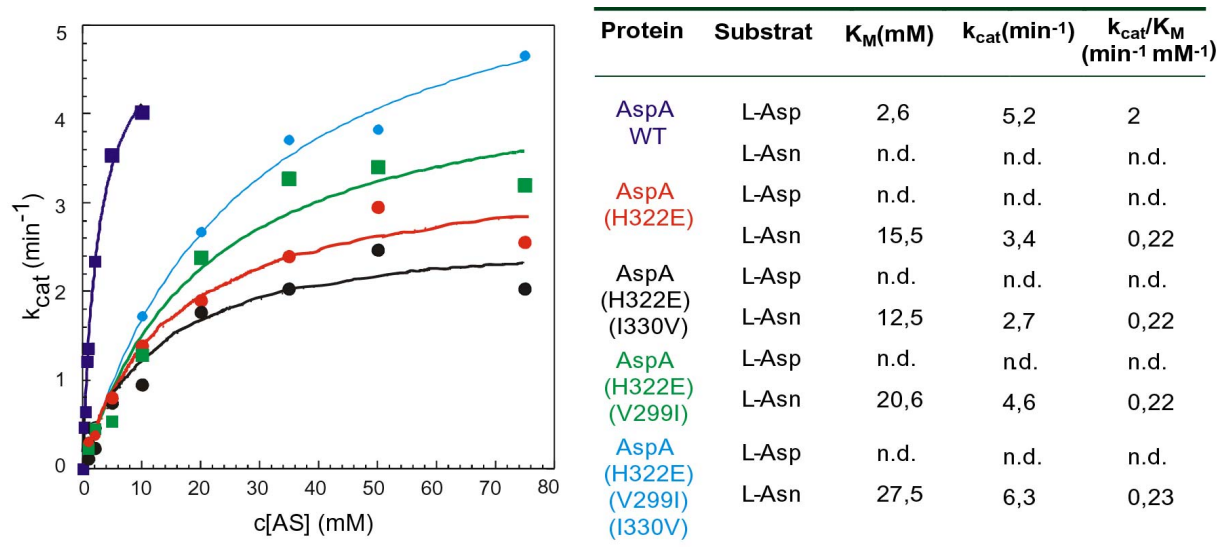


Abb. 5.5: Katalytische Effizienz der konstruierten AspA*-Proteine
n.d. nicht determiniert

5.3 Veränderung der Substrat-Selektivität von C-A_{Glu}-PCP (SrfA-A1)

Nachdem gezeigt wurde, dass die Selektivität der einzelständigen A-Domäne AspA durch Einführung einer Mutation von der kognaten Aminosäure L-Asp zum korrespondierenden Seitenkettenamid L-Asn verändert werden konnte, sollte nun die gleiche Methode auf eine A-Domäne im Verbund eines ganzen Moduls angewendet werden. Hierfür wurde das Elongations-Modul 1 C-A_{Glu}-PCP (SrfA-A1) des Surfactin-Biosynthese-Genklusters ausgewählt, welches für den Einbau der ersten Aminosäure L-Glu in das Lipoheptapeptid verantwortlich ist [Cosmina *et al.*, 1993]. Die Substrat-Selektivität von SrfA-A1 sollte hierbei ebenfalls von der kognaten Aminosäure L-Glu hin zum korrespondierenden Seitenkettenamid L-Gln verändert werden. In Abb. 5.6

ist die putative Bindungstasche für die Aktivierung von L-Glu in SrfA-A1 im Vergleich mit der L-Gln-aktivierenden Bindungstasche von LicA1 dargestellt.

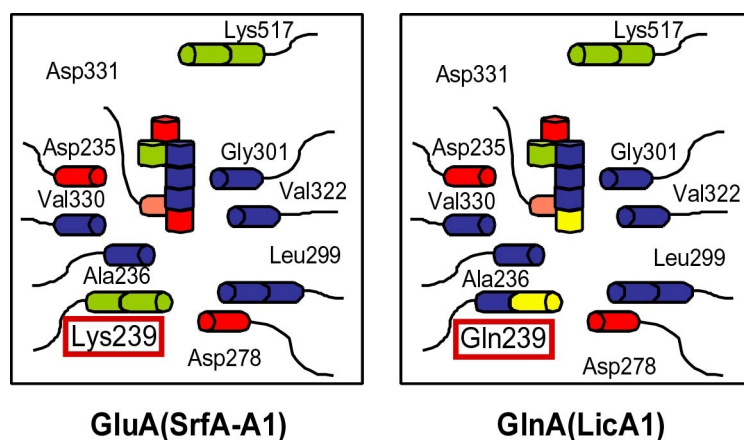


Abb. 5.6: Schematische Darstellung der putativen L-Glu (SrfA-A1) und L-Gln (LicA1) selektiven Bindungstaschen basierend auf der Kristallstruktur von PheA.

Die beteiligten aliphatischen (blau), polaren (gelb), sauren (rot) und basischen (grün) Seitenketten sind schematisch dargestellt. Die variierende Aminosäure an Position 239 ist in rot hervorgehoben.

Beim Vergleich dieser beiden Bindungstaschen fällt auf, dass nur eine Abweichung der beteiligten Seitenketten an der hochvariablen, Selektivitäts-vermittelnden Position 239 zu beobachten ist. Im Falle der L-Glu-aktivierenden A-Domäne von SrfA-A1 kommt es zu einer elektrostatischen Stabilisierung der Carboxyl-Gruppe der Substrat-Seitenkette durch die basische Seitenkette des Restes Lys239. Hingegen wird in LicA1 die polare Seitenkette des L-Gln-Substrates durch die polare Seitenkette von Gln239 stabilisiert. In Übereinstimmung mit diesen Vorraussagen sollte die Einführung der Punktmutation Lys239→Gln in die A-Domäne des Elongations-Moduls C-A_{Glu}-PCP (SrfA-A1) ausreichend sein, um eine gerichtete Veränderung der Selektivität von L-Glu zugunsten des korrespondierenden Seitenkettenamids L-Gln zu erreichen.

5.3.1 Konstruktion und heterologe Produktion von C-A_{Glu}*-PCP

Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde das kodierende DNA-Fragment *srfA-A1* von Dr. Jürgen J. May aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 amplifiziert und in den His₆-tag Expressionsvektor pQE60 kloniert. Nach Verifizierung des erhaltenen Ausgangsplasmids pC-A_{Glu}PCP mittels Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung wurde der Aminosäure-Austausch an Position Lys239→Gln durch ortsgerichtete Mutagenese in das DNA-Fragment eingeführt. Die Verifizierung des erhaltenen Plasmids pC-A_{Glu}PCP(K239Q) erfolgte ebenfalls durch Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung.

Die Überproduktion der His₆-tag Proteine erfolgte heterolog in *E. coli* M15[pREP4]. Im Falle des Wildtyp-Proteins C-A_{Glu}-PCP, sowie der Mutante C-A_{Glu}-

PCP(Lys239Gln) konnte nach IPTG-Induktion ein lösliches Protein von ca. 118 kDa erhalten werden, welches mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden konnte (siehe Abb. 5.7).

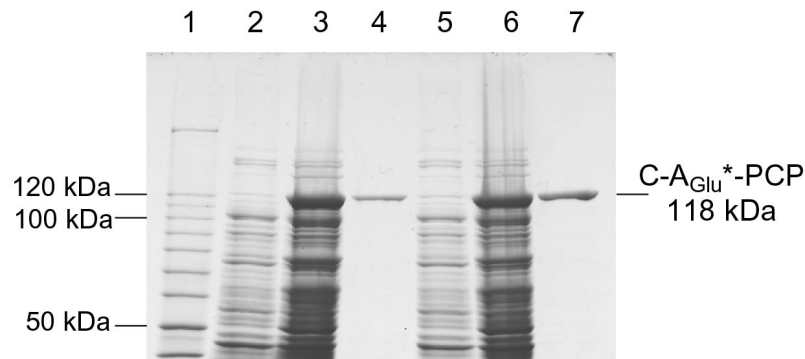


Abb. 5.7: Produktion und Reinigung von C-A_{Glu}*-PCP

Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, welches die Produktion in *E. coli* M15[pREP4] und Reinigung mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie von C-A_{Glu}-PCP (Bahn2-4) und der Einzelmutante C-A_{Glu}-PCP(Lys239Gln) (Bahn 5-7) zeigt. Spur 1 Proteinmarker, Spuren 2 und 5 Gesamtzellextrakt vor Induktion, Spuren 3 und 6 Gesamtzellextrakt nach 2h Induktion und Spuren 4 und 7 gereinigte Proteine nach Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie.

Die Bestimmung der Substrat-Selektivität der beiden Proteine erfolgte mittels Aminosäure-abhängiger ATP/Pyrophosphat-Austauschreaktionen (siehe Abb. 5.8).

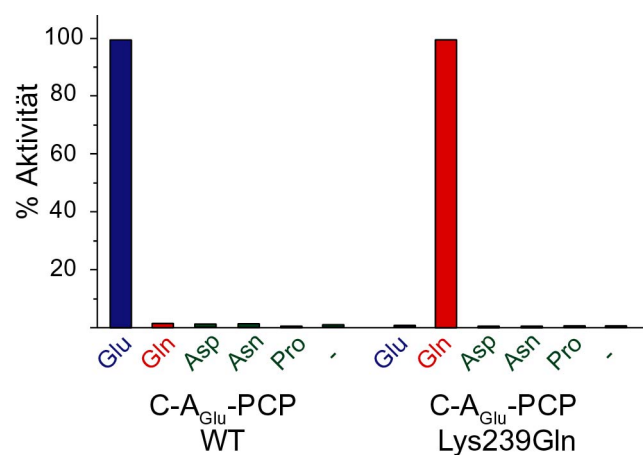


Abb. 5.8: Bestimmung der Substrat-Selektivität von C-A_{Glu}*-PCP

Biochemische Charakterisierung des gereinigten C-A_{Glu}-PCP Wildtyp-Proteins, sowie der Einzelmutante C-A_{Glu}-PCP(Lys239→Gln) mittels ATP/PP_i-Austausches. Die höchste Austauschrate des entsprechenden Proteins wurde auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse der Reaktionen mit dem nativen Substrat L-Glu sind in blau, mit dem verwandten Seitenkettenamid L-Gln in rot und die Kontrollen mit den mis-kognaten Aminosäuren L-Asp, L-Asn und L-Pro, sowie ohne ATP(-) in grün gezeigt.

Hierbei konnte für das Wildtyp-Protein C-A_{Glu}-PCP eine selektive Aktivierung der kognaten Aminosäure L-Glu nachgewiesen werden. Für das entsprechende Seitenkettenamid L-Gln, sowie die mis-kognaten Aminosäuren L-Asp, L-Asn und L-Pro wurde keine messbare Aktivierung beobachtet. Die biochemische Charakterisierung der Einzelmutante C-A_{Glu}-PCP(Lys239Gln) zeigte hingegen eine spezifische Aktivierung von L-Gln, während keine messbare Aktivierung des

ursprünglichen Substrates L-Glu, sowie der mis-kognaten Aminosäure L-Asp, L-Asn und L-Pro nachgewiesen werden konnte.

5.3.2 Katalytische Effizienz von C-A_{Glu}*-PCP

Im Falle der einzelständigen A-Domäne AspA* (siehe 5.2.3) wurde ein Verlust der katalytischen Aktivität bei der Veränderung der Substrat-Selektivität durch ortsgerichtete Mutagenese beobachtet. Um zu überprüfen, ob es sich bei diesem Phänomen um ein allgemeines Problem dieser Methode handelt oder Fall-spezifisch ist, wurde die katalytische Aktivität der heterolog überproduzierten und gereinigten Proteine C-A_{Glu}*-PCP in L-Glu- bzw. L-Gln-abhängigen ATP/Pyrophosphat-Austauschreaktionen analysiert (siehe Abb. 5.9).

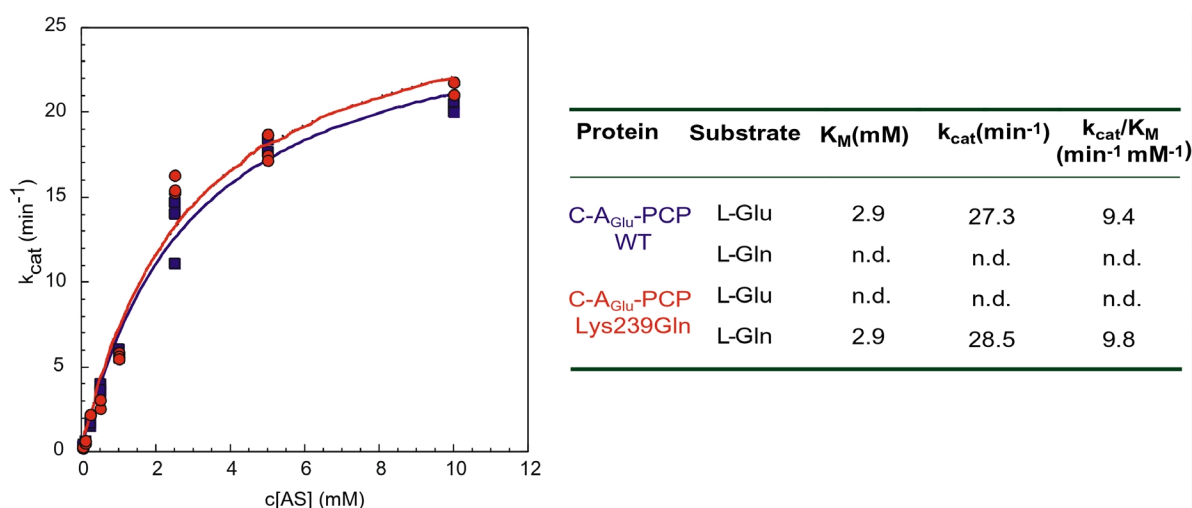


Abb. 5.9: Katalytische Effizienz der konstruierten C-A_{Glu}*-PCP-Proteine
n.d. nicht determiniert

Erfreulicherweise führte die Integration der Punktmutation Lys239Gln in das Proteintemplat C-A_{Glu}-PCP zu keiner Erniedrigung der katalytischen Aktivität des Proteins. Sowohl das Wildtyp-Protein C-A_{Glu}-PCP ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 9,4 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$), als auch die Einzelmutante C-A_{Glu}-PCP(Lys239→Gln) ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 9,8 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$) zeigen eine vergleichbare katalytische Effizienz für die Aktivierung der jeweiligen Substrat-Aminosäuren.

5.4 Manipulation des Surfactin-Biosynthese-Genclusters

Nachdem am Beispiel der alleinstehenden A-Domäne AspA (SrfA-B2), sowie des vollständigen Elongations-Moduls C-A_{Glu}-PCP (SrfA-A1) gezeigt werden konnte, dass durch Einführung von einzelnen Mutationen die Substrat-Selektivität von A-

Domänen *in vitro* verändert werden kann, sollte diese Methode nun auf einen *in vivo*-Ansatz erweitert werden. Als Modellsystem diene das Surfactin-Biosynthese-Operon aus *B. subtilis* ATCC 21332 (siehe Abb. 5.10) [Cosmina *et al.*, 1993].

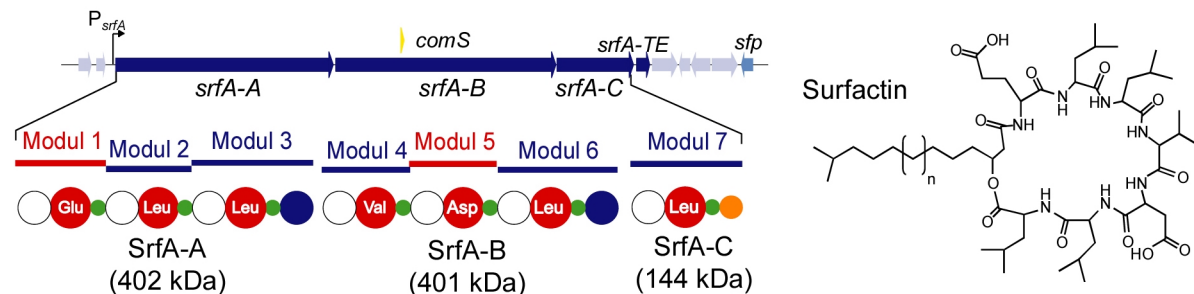


Abb. 5.10: Das Surfactin-Biosynthese-Gencluster

Gezeigt ist die chromosomale Region des Surfactin-Biosynthese-Genclusters (*srfA*) aus *B. subtilis* ATCC 21332 mit den Genen *srfA-ABCTE*. Die drei Peptidsynthetasen SrfA-ABC katalysieren die Bildung des Lipopeptides Surfactin, dessen Struktur im Hinblick auf die Länge der eingebauten β -Hydroxy-Fettsäure variabel ist ($n = 1 - 3$)

5.4.1 Veränderung der Substrat-Selektivität von SrfA-B2

Zuerst sollte untersucht werden, ob durch ortsgerichtete Mutagenese ein Austausch der konservierten Aminosäure L-Asp an Position 5 (SrfA-B2) des Lipopeptides möglich ist. In früheren Studien hatte Dr. Axel Schneider versucht, durch den Austausch von Minimalmodulen eine alternative Aminosäure an Position 5 in das Produkt zu insertieren [Schneider, 1996]. Jedoch konnten mit dieser Methode keine neuen Surfactin-Derivate produziert werden. Als möglicher Grund für dieses negative Ergebnis wurden Störungen der inter- und intramodularen Kommunikation, sowie der Tertiärstruktur innerhalb der generierten Hybridsynthetase vermutet.

In den vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Einführung der Punktmutation His322→Glu in die A-Domäne von SrfA-B2 ausreichend ist, um eine Veränderung der Substrat-Selektivität von L-Asp zu Gunsten des verwandten Seitenkettenamids L-Asn zu erreichen. Da die Einführung weiterer Mutationen keinen positiven Einfluss auf die Substrat-Selektivität und katalytische Aktivität ausübte, wurde in diesem Experiment lediglich die Einzelmutterante AspA(His322→Glu) berücksichtigt. Anhand des beschriebenen Modells für die nichtribosomale Peptidbiosynthese sollte nach Einführung dieser Punktmutation in das fünfte Modul des Proteintemplates der Einbau der alternativen Aminosäure L-Asn in das Lipopeptid erfolgen. Mittels zielgerichteter Mutagenese sollte es also möglich sein, das bislang unbekannte Derivat [Asn⁵]-Surfactin zu erzeugen.

Die Neuprogrammierung des Surfactin-Biosynthese-Genclusters erfolgte unter Verwendung eines zweistufigen Marker-Austausches [Stachelhaus *et al.*, 1996b]. Bei dieser Methode kommt es zuerst zur Unterbrechung des genetischen Locus *srfA-B* durch einen selektierbaren Resistenz-Marker, bevor anschließend die Rekonstitution des Genes erfolgt (siehe Abb. 5.11).

Der hierfür benötigte *srfA-B2*-Deletionsstamm *B. subtilis* AS20 wurde von Dr. Axel Schneider konstruiert [Schneider, 1996]. Das Deletionsplasmid pSRFbΔAsp enthält die 5' und 3' homologen Bereiche von *srfA-B2*, welche durch eine Chloramphenicol-Resistenz-Kassette voneinander getrennt sind. Nach der Transformation des Surfactin-Produzentenstammes *B. subtilis* ATCC 21332 mit dem linearisierten Deletionsplasmid pSRFbΔAsp konnten Chloramphenicol-resistente Transformanten erhalten werden. Die korrekte Unterbrechung von *srfA-B2* im Stamm *B. subtilis* AS20 wurde mittels Southern-Blot-Analyse verifiziert (Daten nicht gezeigt).

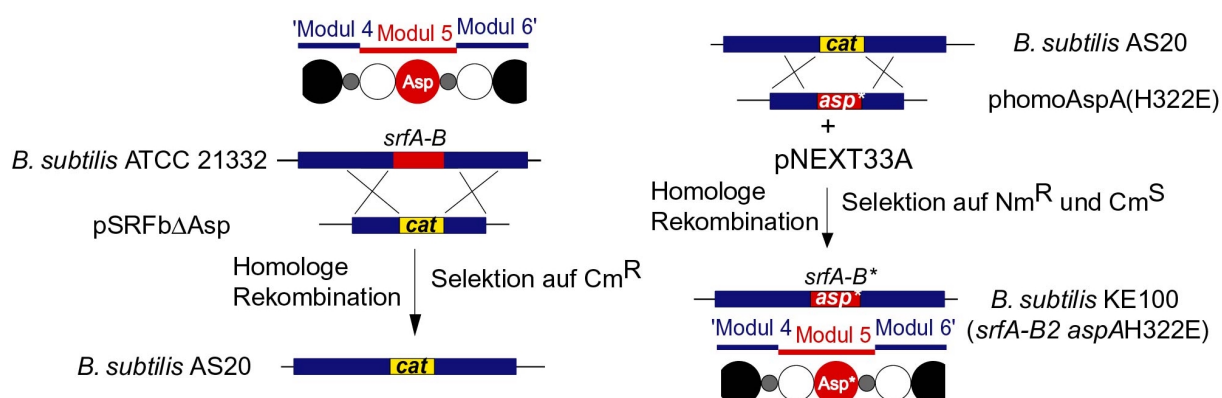


Abb. 5.11: Vereinfachtes Schema des Marker-Austausch-Experimentes an Position 5 des *srfA*-Biosynthese-Operons in *B. subtilis* ATCC 21332

Die Konstruktion des *srfA-B2*-Unterbrechungsstammes *B. subtilis* AS20 erfolgte mittels homologer Rekombination mit dem linearisierten Deletionsplasmid pSRFbΔAsp (links). In einem Kongression-Experiment wurde *B. subtilis* AS20 anschließend mit dem Integrationsplasmid *phomoAspA(H322E)* und dem Helferplasmid *pNEXT33A* transformiert (rechts). Die Rekonstitution von *srfA-B*, sowie die Integration der mutierten Region *aspA(H322E)* in das *Bacillus*-Chromosom erfolgte durch homologe Rekombination. Hierbei konnte der *B. subtilis* Stamm KE100 erhalten werden, welcher die Punktmutation His322→Glu in der A-Domäne des fünften Moduls des Surfactin-Biosynthese-Genclusters trägt.

Die anschließende Rekonstitution von *srfA-B2* erfolgte mittels eines Kongression-Experimentes durch Integration des mutierten Gen-Fragmentes (siehe Abb. 5.11). Hierbei wurde *B. subtilis* AS20 parallel mit dem Integrationsplasmid *phomoAsp(H322E)* und dem Helferplasmid *pNEXT33A* transformiert. *phomoAsp(H322E)* enthält neben dem mutierten DNA-Fragment *aspA(H322E)*, welches für die Asparagin-selektive A-Domäne *AspA(His322→Glu)* kodiert, die 5'

und 3' homologen Bereiche für die Rekombination. Der selektierbare Marker *neo* ist auf dem Plasmid pNEXT33A lokalisiert, welches in den *metD*-Locus des *B. subtilis* Chromosoms integriert [Itaya & Tanaka, 1990]. Neomycin-resistente Transformanten wurden selektiert und anschließend auf Chloramphenicol-Sensitivität untersucht. Durch Southern-Blot-Analyse und DNA-Sequenzierung wurde die korrekte Integration des mutierten DNA-Bereiches verifiziert (Daten nicht gezeigt). Der erhaltene *B. subtilis* Stamm, welcher die Punktmutation His322→Glu innerhalb von SrfA-B2 trägt, wurde KE100 benannt. Durch SDS-PAGE-Analyse konnte die Produktion der drei Surfactin-Synthetasen SrfA-AB*C am Übergang der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase gezeigt werden (siehe Abb. 5.13).

5.4.2 Isolierung und Charakterisierung von [Asn⁵]-Surfactin aus *B. subtilis* KE100

Um den Einfluss der eingeführten Punktmutation in dem 10,8kb-umfassenden *srfA-B* Gen bezüglich der Bildung des Lipoheptapeptides zu untersuchen, wurden die Surfactin-Derivate aus den Kulturüberständen des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes ATCC 21332, sowie der Mutante KE100 extrahiert und mittels HPLC/MS analysiert (siehe Abb. 5.12).

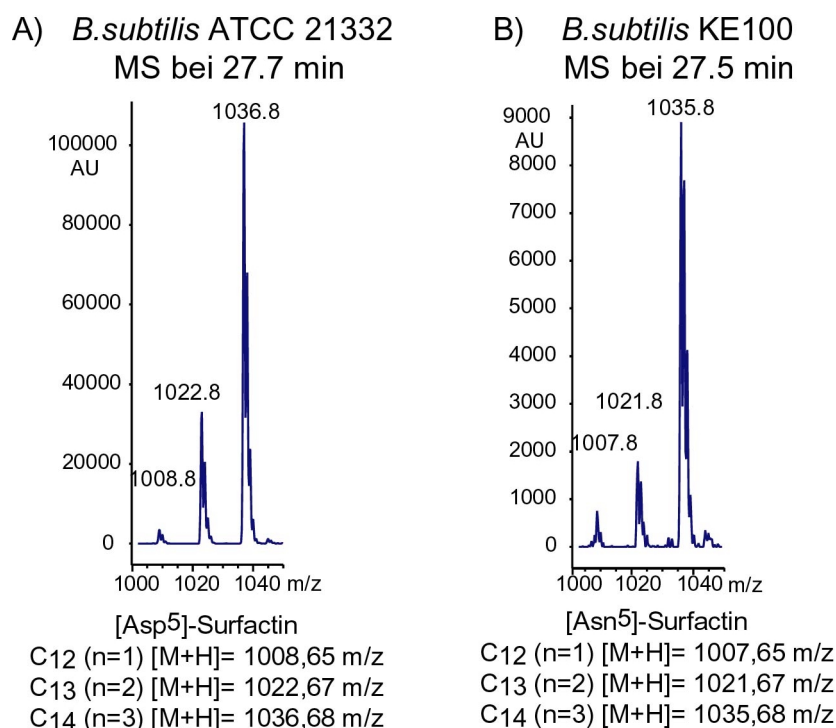


Abb. 5.12: HPLC-MS-Analyse der *B. subtilis* Extrakte

Die Chromatogramme zeigen eindeutig die Produktion der [Asp⁵]-Surfactin-Derivate in *B. subtilis* ATCC 21332 (A), sowie der korrespondierenden [Asn⁵]-Derivate in *B. subtilis* KE100 (B).

Als Negativkontrolle dienten entsprechende Extrakte des Deletionsstammes *B. subtilis* AS20, der nicht in der Lage ist das Lipoheptapeptid zu produzieren. In den Extrakten des Wildtyp-Stammes *B. subtilis* ATCC 21332 konnten Lipopeptide der Massen $[M+H] = 1008,8$ m/z, $[M+H] = 1022,8$ m/z und $[M+H] = 1036,8$ m/z nach 27,7 min (Retentionszeit der HPLC-Analyse) erhalten werden. Hierbei handelt es sich um die erwarteten Massen der bekannten $[\text{Asp}^5]$ -Surfactin-Derivate, welche leichte Variationen bezüglich der Länge der β -Hydroxy-Fettsäure ($n=1-3$) aufweisen (siehe Abb. 5.10). Im Falle der erwarteten Asp zu Asn Substitution in der Mutante KE100 wurden im Gegensatz hierzu Lipopeptide erwartet, die eine um eine Einheit reduzierte Masse aufweisen. Tatsächlich konnten in den Extrakten der Punktmutante *B. subtilis* KE100 diese neuen $[\text{Asn}^5]$ -Surfactin-Derivate mit einer Retentionszeit von 27,5 min nachgewiesen werden ($(\text{C}_{12})[M+H] = 1007,8$ m/z, $(\text{C}_{13})[M+H] = 1021,8$ m/z, und $(\text{C}_{14})[M+H] = 1035,8$ m/z). Hierbei fiel auf, dass sich die Muster der gebildeten Produkte bezüglich der Länge der eingebauten Fettsäuren nicht unterschieden und in beiden Fällen, Wildtyp und Mutante KE100, das C_{14} -Derivat ($n=2$) das Hauptprodukt darstellte.

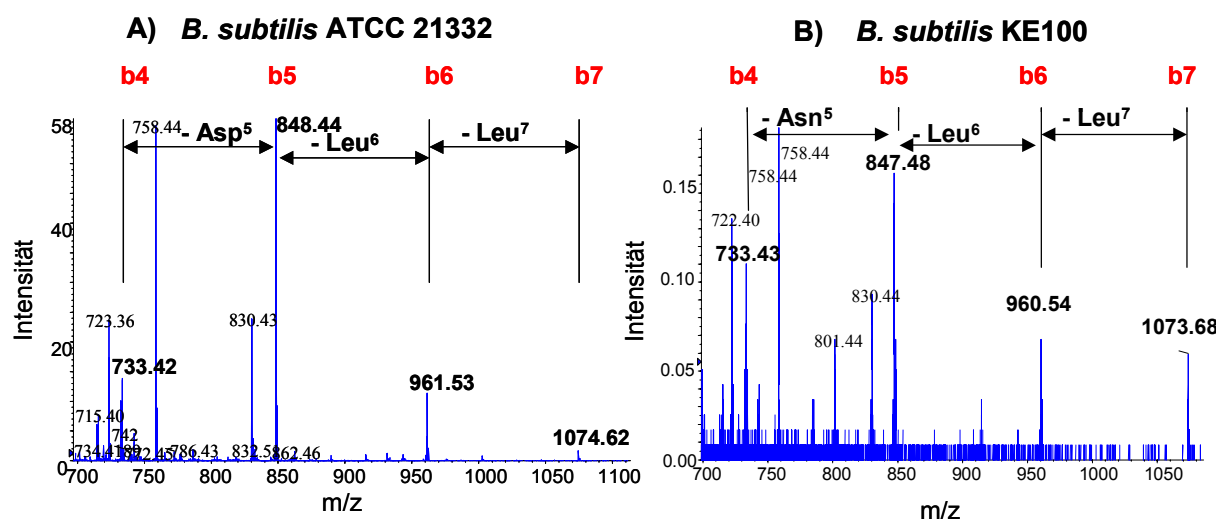


Abb. 5.13: MS/MS Spektren der Surfactin-Derivate

Gezeigt ist die MS/MS-Fragmentierungen der C_{14} -Surfactine $[\text{M}+\text{K}]$ aus *B. subtilis* ATCC 21332 (A) und KE100 (B).

Zur weiteren Charakterisierung der Surfactin-Derivate wurde eine gekoppelte MS/MS-Analyse durchgeführt. Hierbei wurden die $[\text{M}+\text{K}]$ -Peaks der C_{14} -Derivate ($[\text{Asp}^5]\text{Surfactin} = 1074,62$ m/z, $[\text{Asn}^5]\text{Surfactin} = 1073,68$ m/z) ausgewählt und in der Kollisionszelle des verwendeten Q-Star Pulsar-Massenspektrometers fragmentiert. In

der Ionenfalle entstanden hierbei die erwarteten y- und b-Ionen, wobei in Abb. 5.13 die gefundenen b-Serien für das Wildtyp- und das Mutanten-Lipoheptapeptid exemplarisch dargestellt sind. Die gezeigten Spektren belegen eindeutig den erwarteten Massenunterschied von einer Masseneinheit für die Produkt-Ionen b5, b6 und b7. Nach Abspaltung der variierenden Aminosäure an Position 5 (L-Asp für Wildtyp, L-Asn für KE100) kann jedoch – wie erwartet – für das zugehörige Fragment-Ion b4 kein Massenunterschied mehr detektiert werden.

Neben dem neuen Lipoheptapeptid [Asn⁵]-Surfactin (siehe Abb. 5.15, bei 27,5 min (C₁₄) [M+H] = 1035,8 m/z) wurde überraschenderweise im Extrakt der Mutante *B. subtilis* KE100 auch das Wildtyp-[Asp⁵]-Surfactin (bei 27,7 min (C₁₄) [M+H] = 1036,8 m/z) detektiert. Die Bildung des Lipopeptid-Gemisches lässt sich entweder auf eine relaxierte Selektivität der vollständigen Synthetase SrfA-B* für das alternative Substrat L-Asp oder auf eine Instabilität des gebildeten [Asn⁵]-Surfactin zurückführen.

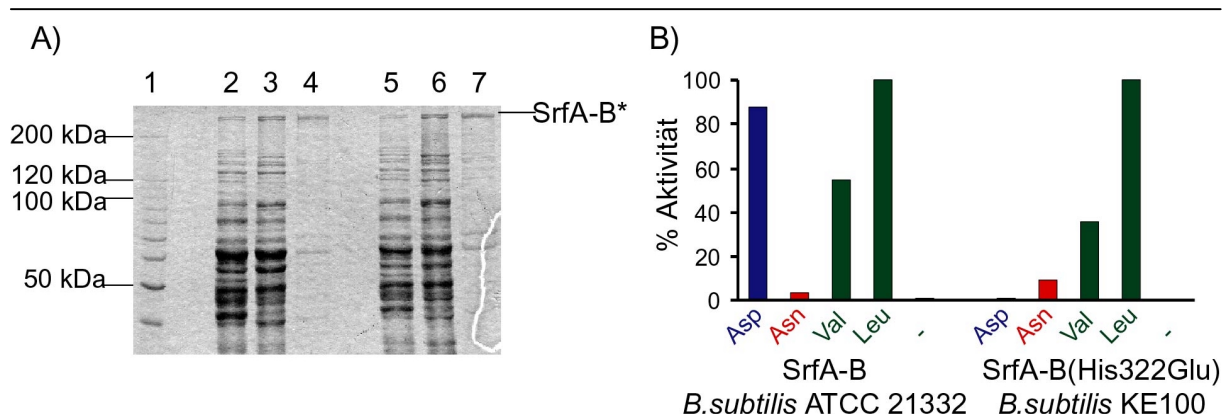


Abb. 5.14: Reinigung und biochemische Charakterisierung von SrfA-B*

A) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, welches die Produktion und Reinigung von SrfA-B (401 kDa) aus *B. subtilis* ATCC 21332 (Bahn 2-4) und SrfA-B(His322Glu) aus KE100 (Bahn 5-7) zeigt. Bahn 1: Proteinmarker, Bahn 2+5: Übergang in die stationäre Wachstumsphase, Bahn 3+6: Pellet der 50%(NH₄)₂SO₄-Fällung, Bahn 4+7: dialysierte, gereinigte Proteine nach Molekularsieb-Chromatographie. **B)** Biochemische Charakterisierung von SrfA-B und SrfA-B(His322Glu) mittels ATP/PPI-Austauschreaktionen. Die höchste Austauschrate des entsprechenden Proteins wurde auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse der Reaktionen mit dem nativen Substrat L-Asp sind in blau, mit dem verwandten Seitenkettenamid L-Asn in rot und weiteren kognaten Aminosäuren L-Leu und L-Val sowie ohne ATP(-) in grün gezeigt.

Um eine Aussage über die Selektivität der A-Domänen treffen zu können, wurde die Surfactin-Synthetase B* aus den Gesamtzellextrakten von *B. subtilis* ATCC 21332 und KE100 mittels Ammoniumsulfat-Fällung und Molekularsieb-Chromatographie gereinigt und nachfolgend biochemisch charakterisiert (siehe Abb. 5.14). Für die beiden gereinigten Surfactin-Synthetasen B* konnte eine spezifische Aktivierung der kognaten Substrate L-Leu (SrfA-B3) und L-Val (SrfA-B1) detektiert

werden. Das Wildtyp-Enzym aus *B. subtilis* ATCC 21332 zeigt darüber hinaus eine spezifische Aktivierung des nativen Substrats L-Asp (SrfA-B2; 88%), während nur eine schwache Aktivierung des verwandten Seitenkettenamids L-Asn (3%) detektiert werden konnte. Die Mutante SrfA-B(His322Glu) aus *B. subtilis* KE100 hingegen zeigt zwar keine Aktivierung der Säure L-Asp (0,9%), jedoch eine schwache Aktivierung des alternativen Substrates L-Asn (9%). Diese schwache Austausch-Rate kann auf die bereits in den *in vitro*-Experimenten beobachtete, verringerte katalytische Aktivität der Mutante zurückgeführt werden (siehe 5.2.3).

Die Selektivität von NRPS wird hauptsächlich durch die A-Domänen determiniert. Zusätzlich konnte jedoch eine Akzeptor-Selektivität der C-Domänen nachgewiesen werden [Belshaw *et al.*, 1999]. In unserem Fall könnte eine entsprechende Selektivität der C-Domäne von SrfA-B2 bewirken, dass weiterhin ihr natives Substrat L-Asp dem verwandten Seitenkettenamid L-Asn vorgezogen und somit die Bildung des Wildtyp-[Asp⁵]-Surfactins unterstützt wird. C-Domänen können ohne weiteres nicht direkt untersucht werden, doch scheint zumindest aufgrund der Befunde der ATP/Pyrophosphat-Austauschreaktionen eine relaxierte Selektivität der Surfactin-Synthetase SrfA-B(AspA His322Glu) als mögliche Ursache der Bildung des Wildtyp-Surfactin in der Mutante KE100 zu entfallen.

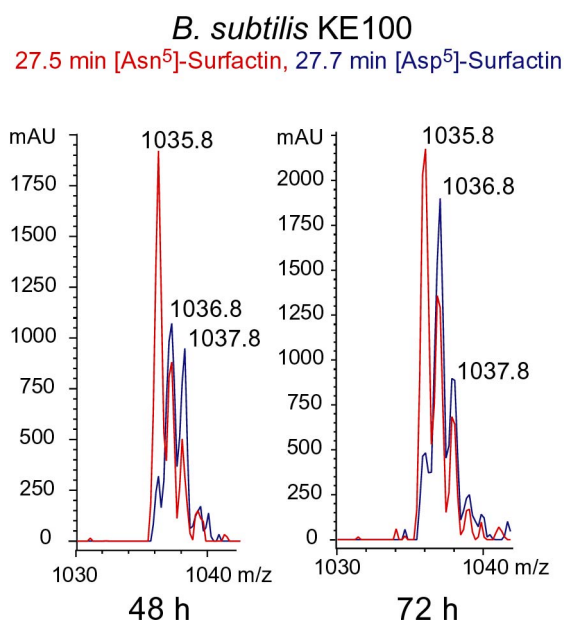


Abb. 5.15: Zeitabhängiges Verhältnis der [Asn⁵]- und [Asp⁵]-Surfactin Derivate

Dargestellt ist die Analyse der Extrakte von *B. subtilis* KE100 nach 48h und 72h. Die Peaks für das neue [Asn⁵]-Surfactin (27.5 min, 1035.8 m/z) sind in rot, die Peaks für das Wildtyp [Asp⁵]-Surfactin Derivat (27.7 min, 1036.8 m/z) sind in blau dargestellt. Bei 48 h ergibt sich ein Verhältnis zwischen [Asn⁵]- und [Asp⁵]-Surfactin von 100:55, während nach 72 h ein Verhältnis von 100:86 erhalten wird.

Die Bildung des Wildtyp-[Asp⁵]-Surfactins lässt sich weiterhin durch eine Instabilität des neuen [Asn⁵]-Derivates erklären. In einer Vielzahl von Peptiden und Proteinen konnte eine Desamidierung von L-Asn-Resten beobachtet werden [Bischoff & Kolbe, 1994]. Hierbei kommt es zur Umwandlung des Seitenkettenamids in die verwandte Säure L-Asp. In unserem Falle würde hierdurch das neue [Asn⁵]-Surfactin in das Wildtyp-Lipoheptapeptid umgewandelt werden. Zur Klärung, ob die Bildung des [Asp⁵]-Surfactins auf eine Instabilität des Produktes zurückzuführen ist, wurde die zeitabhängige Entstehung von [Asp⁵]-Surfactin in Extrakten der Mutante *B. subtilis* KE100 untersucht. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (12h, 24h, 48h und 72h) wurden Proben in SpIII-Medium genommen, mit n-Butanol extrahiert und mittels HPLC/MS analysiert. Wie in Abb. 5.15 dargestellt, lag das Produktverhältnis zwischen [Asn⁵]- und [Asp⁵]-Surfactin nach 48h bei etwa 2:1, während nach 72h ein Verhältnis von ca. 1:1 bemessen wurde. Diese relative Zunahme an Wildtyp-Surfactin spricht eindeutig für einen zeitabhängigen Abbau und eine Instabilität (Desamidierung) des neuen [Asn⁵]-Surfactin-Derivats und gegen eine System-inhärente Selektivität z. B. der C-Domäne.

5.4.3 Veränderung der Substrat-Selektivität von SrfA-A1

Nachdem die erfolgreiche Veränderung der Substrat-Selektivität von SrfA-B2* innerhalb des vollständigen Surfactin-Biosynthese-Genclusters gezeigt und der Einbau des alternativen Substrats L-Asn an Position 5 des Lipoheptapeptids nachgewiesen werden konnte, sollte nun Gleiches an Position 1 (SrfA-A1) versucht werden (siehe Abb. 5.10). In den vorangegangenen *in vitro*-Experimenten wurde gezeigt, dass eine Veränderung der Selektivität von SrfA-A1 von der sauren Aminosäure L-Glu zum verwandten Seitenkettenamid L-Gln durch Einführung einer einzigen Punktmutation Lys239→Gln in die korrespondierende A-Domäne erreicht werden kann. Nach diesen *in vitro*-Analysen sollte nun untersucht werden, ob die Einführung dieser Punktmutation in das erste Elongations-Modul des Surfactin-Biosynthese-Genclusters zur Produktion des veränderten [Gln¹]-Surfactins führt.

Bei der Unterbrechung von *srfA-A1* im Chromosom von *B. subtilis* ATCC21332 musste beachtet werden, dass die Expression von *comS*, welches innerhalb des kodierenden Bereiches des vierten Moduls des Surfactin-Biosynthese-Genclusters liegt, gewährleistet sein muss [D'Souza *et al.*, 1994]. Während die Peptidsynthetasen SrfA-ABC die Produktion des Lipopeptides katalysieren, ist ComS (46 Aminosäuren) an der Ausbildung der natürlichen Kompetenz von *B. subtilis* beteiligt. In Abwesen-

heit von ComS liegt der Transkriptionsfaktor der späten Kompetenz-Gene, ComK, in einem inaktiven Komplex mit MecA und ClpC vor, so dass der Organismus nicht in der Lage ist, die natürliche Kompetenz auszubilden [Ogura *et al.*, 1999; Turgay *et al.*, 1997].

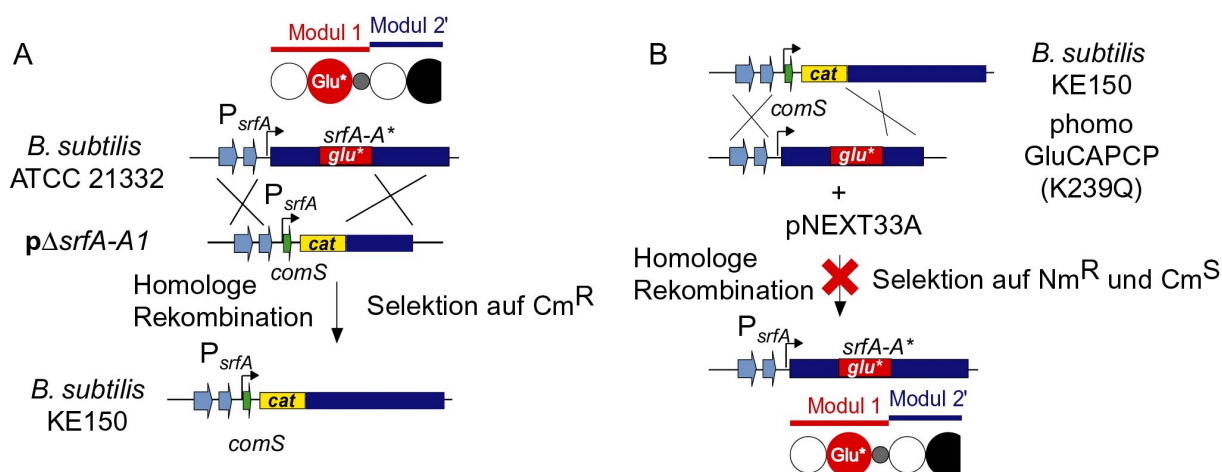


Abb. 5.16: Vereinfachtes Schema des Marker-Austausch-Experimentes an Position 1 des *srfA*-Biosynthese-Operons in *B. subtilis* ATCC 21332

Die Konstruktion des *srfA-A1*-Unterbrechungsstammes *B. subtilis* KE150 erfolgte mittels homologer Rekombination mit dem linearisierten Deletionsplasmids $p\Delta srfA-A1$ (links). In einem Kongressions-Experiment wurde *B. subtilis* KE150 anschließend mit dem Integrationsplasmid phomoGluCAPCP(K239Q) und dem Helferplasmid pNEXT33A transformiert (rechts). Leider konnte keine erfolgreiche Rekonstitution von *srfA-A* und Integration der mutierten Region *gluCAPCP*(K239Q) erreicht werden.

Für die Unterbrechung von *srfA-A1* wurde daher das Deletionsplasmid $p\Delta srfA-A1$ konstruiert. Der 2,5kb-umfassende 5' homologe Bereich (*yckGH*) beinhaltet hierbei den Promotor und Operator des *srfA*-Operons, sowie die RBS des *srfA-A*-Gens. Durch die Fusion von *comS* unter die transkriptionelle Kontrolle des natürlichen *srfA*-Promotors, konnte nach der Unterbrechung des Gens *srfA-A* ein genetisch zugänglicher Stamm erhalten werden. Um eine effiziente Initiation der Translation zu erhalten, wurde das Startkodon von TTG zu ATG verändert. Der 5' homologe Bereich wird gefolgt von dem selektierbaren Resistenz-Marker *cat* und dem 1,8kb-umfassenden 3' homologen Bereich *srfA-A2'*. Nach der Transformation des Surfactin-Produzentenstammes *B. subtilis* ATCC 21332 mit dem linearisierten Deletionsplasmid $p\Delta srfA-A1$ konnten Chloramphenicol-resistente Transformanten erhalten werden (siehe Abb. 5.16). Die korrekte Unterbrechung von *srfA-A1* in dem Stamm *B. subtilis* KE150 wurde mittels Southern-Blot-Analyse verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Die anschließende Rekonstitution von *srfA-A1* sollte durch Integration des mutierten Gen-Fragmentes, welches das Glutamin-selektive Modul C-A_{Glu}-PCP(Lys239→Gln) kodiert, erfolgen. Für das Kongressions-Experiment wurde

B. subtilis KE150 neben dem Helferplasmid pNEXT33A parallel mit dem Integrationsplasmid phomoGluCAPCP(K239Q) transformiert, welches das mutierte DNA-Fragment *srfA-A1*(K239Q) samt 5' und 3' homologen Bereiche für die Rekombination trägt. Die Neomycin-resistenten Transformanten wurden selektiert und anschließend auf Chloramphenicol-Sensitivität untersucht. Bei der Analyse von ca. 5000 Transformanten konnte jedoch kein Neomycin-resistenter Klon erhalten werden, der den Verlust der Chloramphenicol-Resistenz aufwies. Somit konnte keine Rekonstitution von *srfA-A* durch die Integration des mutierten DNA-Fragmentes *srfA-A1*(K239Q) erhalten werden.

Zur Überprüfung des Ausgangssystems wurde die Rekonstitution des *srfA-A*-Gens in *B. subtilis* KE150 mit dem *srfA-A1*-Wildtyp-Fragment (kodiert für das L-Glu-spezifische Elongations-Modul SrfA-A1) durchgeführt. Hierfür wurde *B. subtilis* KE150 mit dem Integrationsplasmid phomoGluCAPCP und dem Helferplasmid pNEXT33A transformiert. Bei der Untersuchung von ca. 500 Neomycin-resistenten Transformanten konnten zehn Chloramphenicol-sensitive Klone erhalten werden. Nach Verifizierung der Integration mittels Southern-Blot-Analyse wurde der rekonstruierte Wildtyp Stamm *B. subtilis* KE160 auf die Fähigkeit der Surfactin-Produktion analysiert. Hierfür wurde der Stamm in SpIII-Medium fermentiert und der Überstand mittels n-Butanol extrahiert. Anhand von HPLC-Analysen konnte die Produktion des erwarteten Wildtyp-Surfactins in der Revertante *B. subtilis* KE160 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Obwohl die Rekonstitution von Wildtyp *srfA-A* in *B. subtilis* KE150 erfolgreich verlief und damit die Integrität des Versuchsaufbaus verifiziert wurde, konnte mittels Kongression keine Integration des mutierten DNA-Fragmentes erhalten werden. Dieses Problem lässt sich zum einen auf eine mögliche toxische Wirkung des neuen Produktes [Gln⁵]-Surfactin auf den Produzentenstamm *B. subtilis* erklären. Ein entsprechender Klon wäre aufgrund der Bildung des für ihn toxischen Lipoheptapeptides nicht in der Lage zu wachsen. Auf der anderen Seite ist es bei dem verwendeten Kongression-Verfahren nicht möglich, direkt auf die Integration und Rekonstitution von *srfA-A* zu selektieren. Somit kann es passieren, dass mögliche Klone zwar die Rekonstitution von *srfA-A* beinhalten, aber nicht den selektierbaren Resistenz-Marker aufgenommen haben. Da nach der Transformation jedoch zuerst auf den Erhalt der Neomycin-Resistenz selektiert wird, würden derartige Klone verloren gehen.

6 Ergebnisse II: Heterologe Expression einer artifiziellen, dimodularen Peptidsynthetase in *B. subtilis* KE30

6.1 Strategie

Eine Vielzahl der bislang bekannten Informationen über die Funktionalität von NRPSs wurden anhand der biochemischen Charakterisierung solcher multifunktionalen Enzyme aus dem Genus *Bacillus* erhalten [Cosmina *et al.*, 1993; Konz *et al.*, 1997; Mootz & Marahiel, 1997; Turgay *et al.*, 1992]. Hierzu wurden in einem ersten Schritt die kodierenden Gene oder Gen-Fragmente in geeignete Expressionsvektoren kloniert und im heterologen Wirt *E. coli* exprimiert. Nach Überproduktion der rekombinanten Proteine erfolgte deren Reinigung und biochemische Charakterisierung *in vitro*. Während dieses Verfahren für die Charakterisierung einzelner Domänen und Modulen erfolgreich angewendet werden konnte, traten jedoch häufig Probleme bei der heterologen Überproduktion multimodularer Enzymkomplexe auf. Bei der Expression dieser Systeme wurden die Proteine in *E. coli* teilweise in unlöslicher oder instabiler Form erhalten. Dies konnte u.a. auf eine unzureichende Faltung dieser großen Proteine zurückgeführt werden [Pfeifer *et al.*, 2001; Symmank *et al.*, 1999]. Weiterhin erfordert die Erlangung der aktiven holo-Form der entsprechenden NRPSs die posttranslationale Modifikation der darin enthaltenen PCP-Domänen mit dem Ko-Faktor Ppant. Diese Konvertierung wird durch spezialisierte PPTasen katalysiert [Lambalot *et al.*, 1996]. Die kommerziell erhältlichen *E. coli* Stämme enthalten jedoch keine geeignete PPTase die in der Lage wäre, die PCP-Domänen der NRPSs zu modifizieren, so dass die Enzyme in diesem Wirt in ihrer inaktiven apo-Form überproduziert werden [Walsh *et al.*, 1997]. Ziel dieser Arbeit war es nun, ein neues heterologes Expressionssystem zu konstruieren, indem die Überproduktion von multifunktionalen NRPSs in aktiver, posttranslational-modifizierter holo-Form möglich ist.

6.2 Der heterologe Wirt *B. subtilis* KE30

Als heterologer Wirt wurde ein Derivat des Surfactin-Produzentenstammes *B. subtilis* ATCC 21332 gewählt [Cooper *et al.*, 1981]. Dieser Organismus ist gut untersucht, und viele genetische und fermentative Methoden sind bekannt. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung eines nativen NRP-Produzenten ist das Vorhandensein

einer inhärenten PPTase, welche die Konvertierung der heterolog produzierten NRPS zur aktiven holo-Form katalysieren kann. Im Falle von *B. subtilis* handelt es sich hierbei um Sfp [Cosmina *et al.*, 1993], welches eine breite Substrat-Selektivität besitzt [Quadri *et al.*, 1998]. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass der Stamm in der Lage ist, neben den inhärenten NRPSs auch fremde, multimodulare Proteintemplate in aktiver und löslicher Form zu produzieren.

Ein Problem bei der Verwendung von *B. subtilis* stellt jedoch die beschriebene Plasmid-Instabilität dar, welche die Integration der rekombinanten Gene in das Chromosom erforderlich macht [Bron *et al.*, 1991; Ehrlich *et al.*, 1986].

Um Wechselwirkungen zwischen dem Surfactin-Biosynthese-Gencluster und den heterologen NRPSs-Systemen ausschließen zu können, sollte der *srfA*-Deletionsstamm *B. subtilis* KE30 für die heterologe Expression der NRPS-Gene verwendet werden [Eppelmann *et al.*, 2001]. Bei diesem Stamm handelt es sich um ein Derivat des Surfactin-Produzentenstammes *B. subtilis* ATCC 21332, welcher die Deletion des 26kb-umfassenden Surfactin-Biosynthese-Operons trägt.

Die Deletion des vollständigen Surfactin-Biosynthese-Operons, welches aus den Genen *srfA-ABCTE* besteht, führt gleichzeitig zum Verlust des Kompetenz-Regulator-Gens *comS*, welches in einem anderen Leserahmen innerhalb von *srfA-B1* lokalisiert ist [D'Souza *et al.*, 1994]. Da die Anwesenheit von ComS jedoch essentiell für die Ausbildung der natürlichen Kompetenz von *B. subtilis* ist [Ogura *et al.*, 1999; Turgay *et al.*, 1997], wurde bei der Deletion darauf geachtet, dass die transkriptionelle Kontrolle des kodierenden Gens *comS* unter dem nativen *srfA*-Promotor erhalten bleibt. Um eine Erhöhung der Transformations-Effizienz zu erlangen, wurde eine zweite Kopie von *comS* unter der transkriptionellen Kontrolle des induzierbaren *spac*-Promotors in die *amyE*-Region des Chromosoms integriert [Liu *et al.*, 1996]. Anhand dieser Strategie war es möglich, den genetisch-zugänglichen *srfA*-Deletionsstamm *B. subtilis* KE30 zu erhalten.

6.3 Konstruktion der *E. coli* / *B. subtilis* Expressionsvektoren

Um eine breite Anwendbarkeit des zu generierenden Expressionssystems zu gewährleisten, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Sascha Dökel ein neuartiges Vektorsystem konstruiert, welches den *srfA*-Deletionsstamm *B. subtilis* KE30 als heterologen Wirt für die Expression von NRPS-Genen ausnutzt. In diesem System wird die einfache Konstruktion selbst-replizierender Plasmide in *E. coli* mit der

Möglichkeit einer chromosomalen Integration in *B. subtilis* vereint. Weiterhin erlaubt die Verwendung eines bi-funktionalen Promotors die parallele IPTG-induzierbare Expression der Gene in beiden Wirtsorganismen, *B. subtilis* und *E. coli*.

Nachfolgende Kriterien wurden an das System gestellt und in der beschriebenen Weise in den neuen Expressionvektoren realisiert (siehe Abb. 6.1):

1) Aufgrund der Instabilität von Plasmiden in *B. subtilis* sollten die zu konstruierenden Vektoren eine stabile Integration der klonierten Gene in das Chromosom von *B. subtilis* ermöglichen. Zu diesem Zweck beinhalten die vier konstruierten Plasmide pSD193, pSD270, pKE151 und pKE170 die 5' (*yckGH*, 2,5 kb) und 3' (*ycxA'*, 0,9 kb) homologen Bereiche der ehemaligen *srfA*-Region, durch die eine Rekombination in das Chromosom von *B. subtilis* KE30 ermöglicht wird. Die genannten homologen Bereiche liegen in *B. subtilis* KE30 durch die MLS-Resistenz-Kassette getrennt vor und wurden in den Expressionsvektoren durch den selektierbaren Marker *kan* getrennt. Auf diese Weise kann durch Ausbildung eines Km-resistenten und MLS-sensitiven Phänotyps positiv auf eine Doppel-Crossover-Integration in das Chromosom von *B. subtilis* KE30 selektiert werden.

2) Um eine einfache Klonierung zu ermöglichen, enthalten die Plasmide den ColE1-Replikationsursprung und liegen deshalb als selbst-replizierende Einheiten in *E. coli* vor. Weiterhin erlaubt die Anwesenheit der selektierbaren Marker *bla* und *kan* anhand der Ausbildung einer Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz eine positive Selektion in *E. coli*.

3) Klonierte Gene bzw. Genfragmente stehen in den konstruierten Plasmiden unter der Kontrolle des starken T5 P_{N25}-Phagenpromotors, welcher sowohl in *E. coli* als auch *B. subtilis* funktionell ist. In *E. coli* wird der T5 P_{N25}-Phagenpromotor von der vegetativen RNA-Polymerase erkannt [Gentz & Bujard, 1985]. In *B. subtilis* ähnelt er dem vegetativen σ^A -abhängigen Promotor und ermöglicht so ebenfalls die Expression im heterologen Wirt *B. subtilis* [Le Grice, 1990].

4) Um eine effiziente Regulation der Expression zu ermöglichen, beinhalten die Vektoren ein optimiertes Promotor-Operator-Element, welches aus dem T5-Promotor und zwei modifizierten *lac*-Operatorsequenzen besteht (aus pQE60, Qiagen, Hilden, Deutschland). In *E. coli* erfolgt die Ko-Expression des Lac-Repressors *lacI* vom Helferplasmid pREP4 aus, während in *B. subtilis* KE30 eine chromosomale Kopie von *lacI* in der *amyE*-Region vorliegt.

5) Die multiplen Klonierungsbereiche (*multiple cloning sites*, MCSs) in pSD193 (*NcoI*, *SphI* und *BamHI*), pSD270 (*NcoI*, *SphI*, *HpaI* und *BamHI*), pKE151 (*NdeI*, *SphI* und *PacI*) und pKE170 (*NdeI*, *SphI*, *NheI* und *BamHI*) wurden so gewählt, dass sie die Expression der klonierten DNA-Fragmenten ermöglichen. Die Erkennungssequenz der jeweils ersten Restriktionsendonuklease, *NcoI* (CCATGG) bzw. *NdeI* (CATATG), enthalten hierfür ein ATG-Startkodon, welches sich in optimaler Distanz zum T5-Promotor und einer synthetischen RBSII befindet.

Zusätzlich erlauben die Plasmide pSD270 und pKE170 eine C-terminale Fusion der translatierten Proteine mit einem His₆-Tag, welcher eine einfache Reinigung der Proteine mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie ermöglicht.

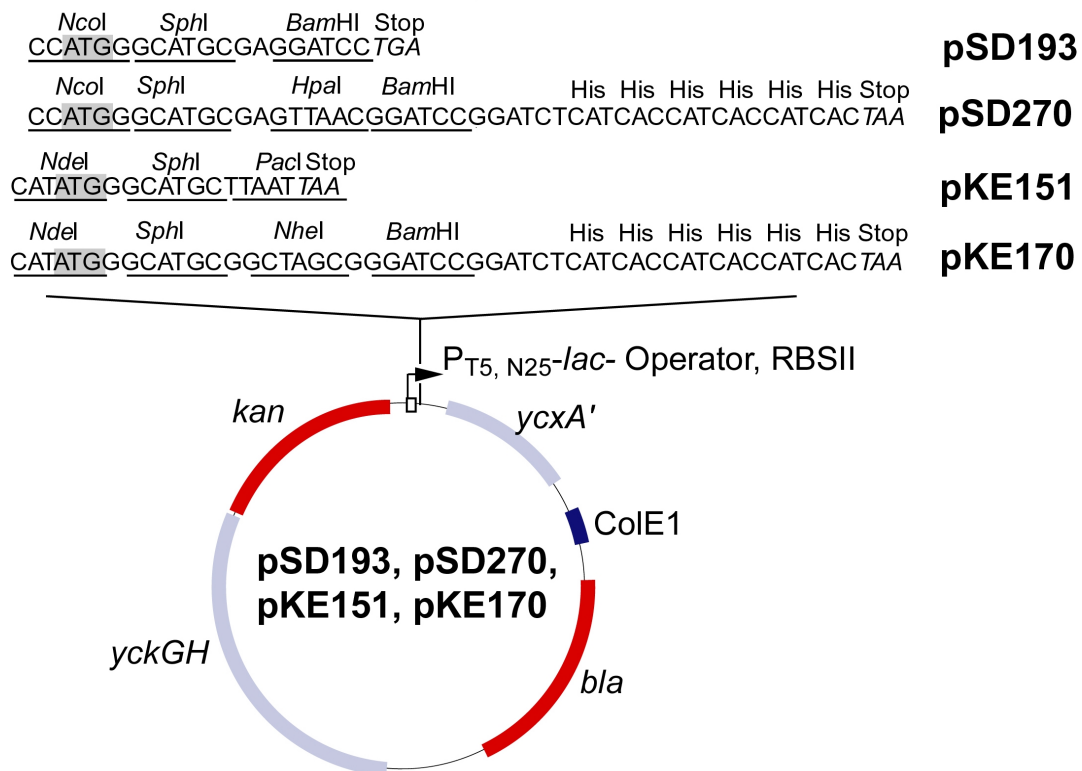


Abb. 6.1: Physikalische Karten der *E. coli* / *B. subtilis* Expressionsvektoren pSD193, pSD270, pKE151 und pKE170

Gezeigt sind die 5' und 3' homologen Regionen (*yckGH* und *ycxA'*, hellblau) für die Integration in die ehemalige *srfA*-Region von *B. subtilis*, der Replikationsursprung *ColE1* (blau), sowie die selektierbaren Marker *kan* und *bla* (rot). Die Lage des T5 P_{N25}-Phagenpromotors, des *lac*-Operators sowie der RBSII ist mit einem Pfeil dargestellt. Die relevanten Nukleotidsequenzen der MCSs, der His₆-Tag-Fusionen, sowie der Stopkodons sind im Detail gezeigt.

6.4 Überproduktion der artifiziellen dimodularen Hybridsynthetase $C_{srfA-A1}-(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)_{srfA-B2-3}(-His_6)$ in *E. coli* und *B. subtilis*

Die Verwendung und Funktionalität der konstruierten Expressionsvektoren sollte am Beispiel eines dimodularen Hybridsynthetasen-Gens in *E. coli* M15[pREP4] und *B. subtilis* KE30 demonstriert werden. Die kodierte Hybridsynthetase $C_{srfA-A1}-(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)_{srfA-B2-3}$ stellte hierbei eine artifizielle Fusion von zwei NRPS-Domänen dar, wobei das interne Fragment der Surfactin-Synthetase SrfA-B ($A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)_{srfA-B2-3}$ N-terminal mit der C-Domäne von *srfA-A1* fusioniert wurde. Um die Produktion der Hybridsynthetase in den heterologen Wirten *E. coli* und *B. subtilis* mit und ohne Fusion eines His₆-Tags miteinander vergleichen zu können, wurde das kodierende DNA-Fragment exemplarisch in die konstruierten Expressionsvektoren pSD193 und pKE170 kloniert. Diese Klonierung lieferte die Plasmide pSD197 (pSD193-Derivat) und pKE203 (pKE170-Derivat).

Zuerst wurde die Produktion der His₆-Tag-Fusion der Hybridsynthetase $C_{srfA-A1}-(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)_{srfA-B2-3}$ untersucht. Hierfür wurden sowohl *E. coli* M15[pREP4] als auch *B. subtilis* KE30 mit dem Expressionsplasmid pKE203 transformiert.

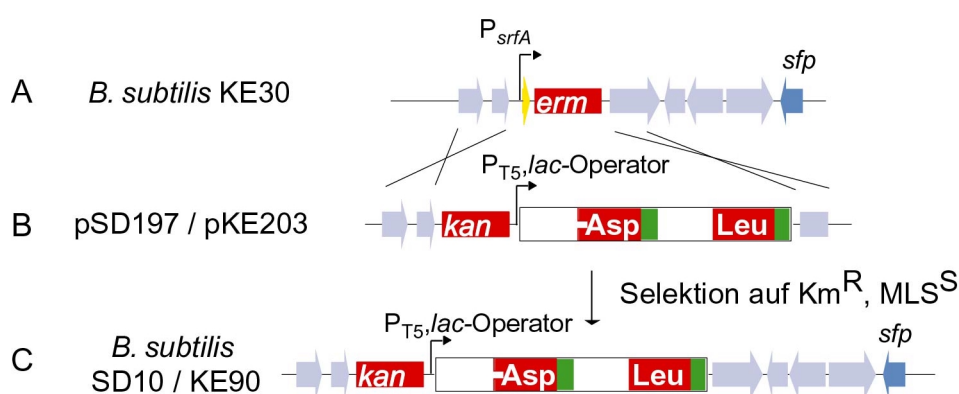


Abb. 6.2: Integration der dimodularen Hybridsynthetase in *B. subtilis* KE30

Schematisches Diagramm zur Konstruktion von *B. subtilis* KE90 und SD10. Die homologe Rekombination der linearisierten Plasmide pKE203 und pSD197 in das Chromosom von *B. subtilis* KE30 lieferte die *B. subtilis*-Stämme KE90 bzw. SD10 (C).

Bei der Transformation von *B. subtilis* KE30 mit dem linearisierten Expressionsplasmid pKE203 wurden, wie in Abb. 6.2 gezeigt, Km-resistente Transformanten erhalten, die nachfolgend auf den Verlust ihrer MLS-Resistenz untersucht wurden. Die korrekte chromosomale Integration des Hybridsynthetasen-Gens in den

erhaltenen Stamm *B. subtilis* KE90 erfolgte mittels Southern-Blot-Analyse, sowie durch DNA-Sequenzierung der 5' und 3'-Insertionsstellen. Anhand von SDS-PAGE-Analysen konnte die IPTG-induzierte Überproduktion eines Proteins der erwarteten Größe von ca. 210 kDa in *B. subtilis* KE90 nachgewiesen werden, welches mittels Ni^{2+} -NTA-Chromatographie gereinigt werden konnte (siehe Abb. 6.3A).

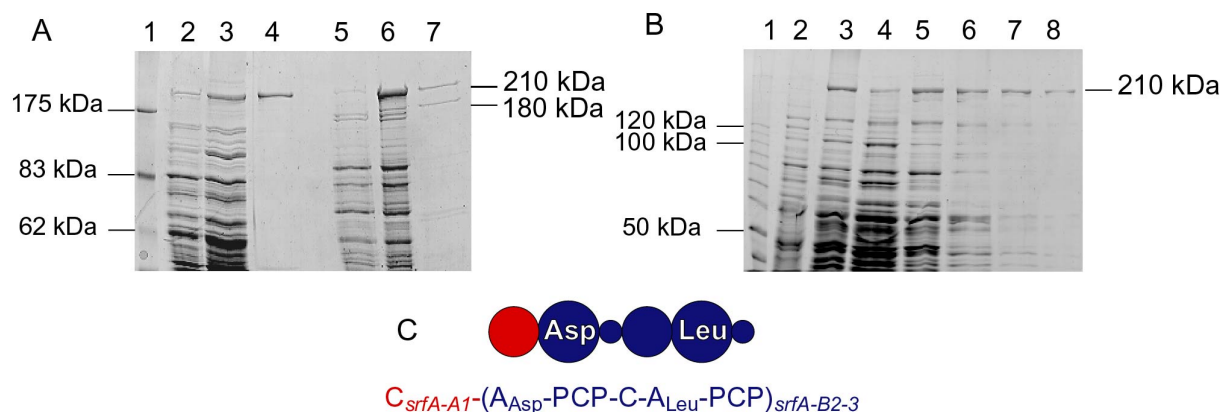


Abb. 6.3: Expression des rekombinanten Hybrid-NRPS-Gens in *B. subtilis* und *E. coli*

(A) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, welches die Produktion der Hybridsynthetase $C_{srfA-A1}-(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)_{srfA-B2-3}$ in *B. subtilis* KE90 (Bahn 2-4) und *E. coli* M15[pKE203, pREP4] (Bahn 5-7), sowie dessen Reinigung mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie zeigt. Bahn 1: Proteinmarker, Bahn 2+5: Gesamtzellextrakte vor Induktion, Bahn 3+6: Gesamtzellextrakte nach 2h Induktion, Bahn 4+7: gereinigten Proteine nach Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie. (B) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, welches die Produktion der Hybridsynthetase $C_{srfA-A1}-(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)_{srfA-B2-3}$ in *B. subtilis* SD10 aufzeigt. Bahn 1: Proteinmarker, Bahn 2: Gesamtzellextrakt vor Induktion, Bahn 3: Gesamtzellextrakt nach 2h Induktion, Bahn 4: Überstand nach dem French-Press-Aufschluß. Die Reinigung des Proteins erfolgte mittels fraktionierter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung (Bahn 5), Molekularsieb-Chromatographie (Bahn 6), Anionen-Austauscher-Chromatographie (Bahn 7), sowie Hydrophober-Interaktions-Chromatographie (Bahn 8). (C) zeigt eine schematische Präsentation der dimodularen Peptidsynthetase.

Bei der parallelen Expressionsanalyse des rekombinanten Hybridgens in *E. coli* M15[pKE203, pREP4] konnte im Gesamtzellextrakt ebenfalls die erwartete, IPTG-induzierte Produktion eines ca. 210 kDa-großen Proteins detektiert werden. Zusätzlich wurde jedoch die Bildung eines weiteren ca. 180 kDa-großen Proteins beobachtet. Bei der nachfolgend durchgeführten Ni^{2+} -NTA-Chromatographie kam es zur Reinigung beider Proteine (siehe Abb. 6.3A).

Da kein alternativer Translations-Startpunkt innerhalb der kodierenden DNA-Region determiniert werden konnte und beide Proteine offensichtlich über einen C-terminalen His_6 -Tag verfügen, ist im Falle des 180 kDa-Proteins von einer partiellen N-terminalen Degradation des Proteins im heterologen Wirt *E. coli* auszugehen. Im Gegensatz hierzu wurde die dimodulare Hybridsynthetase in *B. subtilis* KE90 in einer

stabilen Form überproduziert, da hier keine Degradation des 210 kDa-großen Proteins beobachtet werden konnte.

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse sollte das dimodulare Hybridsystem ohne His₆-Tag-Fusion heterolog in *E. coli* M15[pREP4] und *B. subtilis* KE30 überproduziert werden. Hierfür wurden die beiden Wirte mit dem erhaltenen Expressions-Integrationsplasmid pSD197 transformiert (siehe Abb. 6.2). Bei der Transformation von *B. subtilis* KE30 wurden hierbei Km-resistente Transformanten erhalten, die nachfolgend auf den Verlust ihrer MLS-Resistenz untersucht wurden. Die Kontrolle der korrekten Integration des Hybrid-Gens in das Chromosom von *B. subtilis* SD10 erfolgte mittels Southern-Blot-Analyse und 5' und 3'-terminaler DNA-Sequenzierung.

Wiederum konnte bei der heterologen Produktion der Hybridsynthetase eine *E. coli*-inhärente Instabilität des Proteins nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), womit ein denkbarer negativer Einfluss des His₆-Tags auf die Stabilität des produzierten Proteins ausgeschlossen werden konnte. Erneut wurde keine Degradation der Hybridsynthetase im Produktionsstamm *B. subtilis* SD10 detektiert (siehe Abb. 6.3B). Zum Zwecke einer nachfolgenden biochemischen Charakterisierung des heterolog-produzierten Proteins, erfolgte dessen Reinigung aus *B. subtilis* SD10 mittels fraktionierter Ammoniumsulfat-Fällung, Molekularsieb-, Anionenaustauscher- und hydrophober Interaktions-Chromatographie. Auch während der Durchführung dieser zeitaufwendigen Prozedur konnte keine Instabilität des Proteins beobachtet werden.

6.5 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten dimodularen Peptidsynthetasen

Anhand der Domänenstruktur der rekombinanten dimodularen Peptidsynthetasen $C_{\text{SrfA-A1}}(\text{A}_{\text{Asp}}\text{-PCP-C-A}_{\text{Leu}}\text{-PCP})_{\text{SrfA-B2-3-His}_6}$ und $C_{\text{SrfA-A1}}(\text{A}_{\text{Asp}}\text{-PCP-C-A}_{\text{Leu}}\text{-PCP})_{\text{SrfA-B2-3}}$, sollten die Hybridproteine in der Lage sein, die Substrat-Aminosäuren L-Asp (SrfA-B2) und L-Leu (SrfA-B3) als Aminoacyl-Adenylat zu aktivieren. Anschließend sollte durch die Ausbildung einer kovalenten Thioester-Bindung die Inkorporation dieser Substrat-Aminosäuren in das Proteintemplat erfolgen.

Zur Charakterisierung der Substrat-Selektivität der gereinigten Hybridsynthetasen aus *E. coli* M15[pKE203, pREP4], sowie aus *B. subtilis* KE90 und SD10 wurden Aminosäure-abhängige ATP/Pyrophosphat-Austauschreaktionen durchgeführt (siehe Abb. 6.4). Für das heterolog-produzierte His₆-Tag-Protein aus *E. coli*

M15[pKE203, pREP4] konnte hierbei eine spezifische Aktivierung der kognaten Aminosäuren L-Asp (43%) und L-Leu (100%) beobachtet werden. Ohne ATP (-; 0,8%) bzw. in Anwesenheit der mis-kognaten Aminosäure L-Phe (0,9%) wurden keine signifikanten Austausch-Reaktionen beobachtet. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die dimodularen Hybridsynthetasen (mit und ohne His₆-Tag) aus *B. subtilis* KE90 und SD10 erhalten, jedoch war in beiden Fällen die Austausch-Aktivität für das kognate Substrat L-Asp signifikant herabgesetzt (18 bzw. 14%).

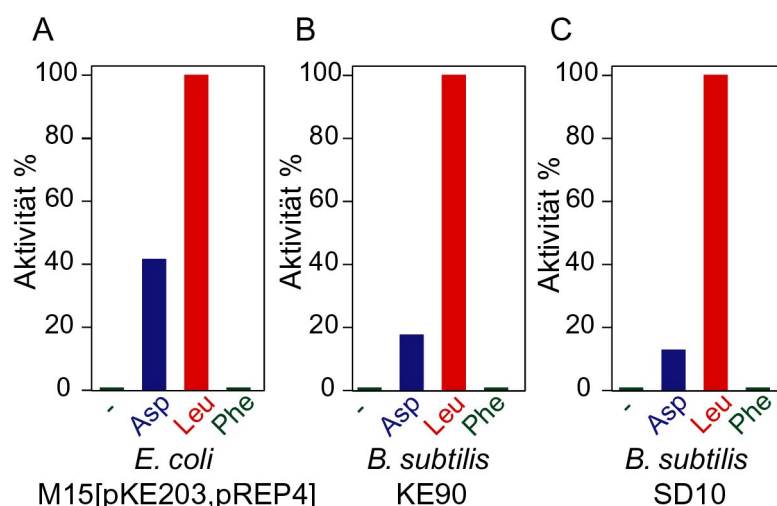
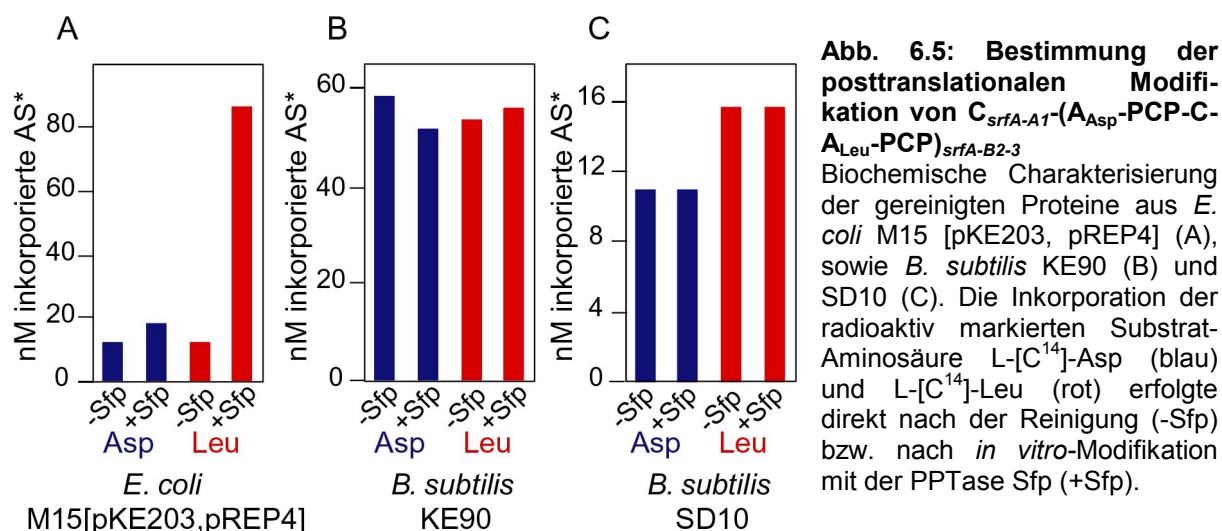


Abb. 6.4: Bestimmung der Substrat-Selektivität von $C_{srfA-A1-(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)_{srfA-B2-3}}$
 Biochemische Charakterisierung der gereinigten Proteine aus *E. coli* M15 [pKE203, pREP4] (A) sowie *B. subtilis* KE90 (B) und SD10 (C). Die höchste Austauschrate des entsprechenden Proteins wurde auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse der Reaktionen mit den kognaten Substrat-Aminosäuren sind in blau (L-Asp) und in rot (L-Leu) gezeigt. Die Austauschraten für die mis-kognate Aminosäure L-Phe sowie ohne ATP(-) sind in grün gezeigt.

Die Inkorporation von radioaktiv-markierten Substrat-Aminosäuren wurde mittels des Thioester-Bildungs-Assays untersucht (siehe Abb. 6.5). Ziel dieses Versuches war es, das Ausmaß der posttranslationalen Modifikation der PCP-Domänen der Hybridsynthetasen mit dem Ko-Faktor Ppant in den heterologen Produktionswirten zu ermitteln. Zur Bestimmung der *in vivo*-Modifikation wurde auch untersucht, ob eine nachträgliche *in vitro*-Modifikation der PCP-Domänen mit der PPTase Sfp zu einer Erhöhung des Aminosäure-Einbaus führte.

Für das heterolog in *E. coli* M15[pKE203, pREP4] überproduzierte Protein $C_{srfA-A1-(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)_{srfA-B2-3}-His_6}$ konnte direkt nach der Reinigung keine signifikante Inkorporation der radioaktiv-markierten Substrat-Aminosäure L-[C¹⁴]-Asp und L-[C¹⁴]-Leu beobachtet werden (siehe Abb. 6.5A). Aufgrund des Fehlens einer geeigneten PPTase ist es in dem heterologen Wirt *E. coli* offensichtlich nicht möglich, eine effiziente Konvertierung der inaktiven apo-PCP-Domänen in die phosphopantetheinylierte holo-Form zu katalysieren. Nach der *in vitro*-Modifikation mit der *B. subtilis* inhärenten PPTase Sfp konnte hingegen die Inkorporation der radioaktiv-markierten Aminosäuren L-[C¹⁴]-Asp und L-[C¹⁴]-Leu detektiert werden. Im

Gegensatz zum *E. coli*-Protein war für die überproduzierten Proteine aus *B. subtilis* KE90 und SD10 die Bildung der Aminoacyl-S-Ppant-Thioester unabhängig von einer nachträglichen *in vitro*-Modifikation mit Sfp. Offensichtlich erfolgte in *B. subtilis* eine vollständige posttranslationale Modifikation der PCP-Domänen bereits *in vivo* durch die inhärente PPTase Sfp, da für beide *B. subtilis* Proteine nach der *in vitro*-Modifikation keine erhöhte Inkorporation der radioaktiv-markierten Substrat-Aminosäure L-[C¹⁴]-Asp und L-[C¹⁴]-Leu beobachtet werden konnte.



Anhand der beschriebenen Ergebnisse lassen sich klare Vorteile der Verwendung des nativen NRP-Produzentenstammes *B. subtilis* für die heterologe Expression von multimodularen NRPSs aufzeigen. Während in *E. coli* die untersuchten Proteine in einer instabilen und - für spätere Beladungsreaktionen - inaktiven apo-Form gebildet werden, erfolgt in *B. subtilis* KE30 die Überproduktion der Proteine in einer stabilen und posttranslational modifizierten, aktiven holo-Form.

7 Ergebnisse III: Heterologe Expression des vollständigen Bacitracin-Biosynthese-Genclusters in *B. subtilis*

7.1 Strategie

Das zyklisch-verzweigte Peptidantibiotikum Bacitracin wird von *B. licheniformis* ATCC 10716 produziert [Haavik & Froyshov, 1975]. Aufgrund seiner strukturellen Besonderheiten, wie z. B. der verzweigt-zyklischen Struktur und des Thiazolin-Ringes in der linearen Peptidkette, stellt das Dodecapeptid ein interessantes Molekül für die gerichtete Veränderung von nichtribosomalen Peptiden dar (siehe Abb. 7.1) [Ikai *et al.*, 1992]. Der Produzentenstamm *B. licheniformis* ATCC 10716 besitzt jedoch, im Gegensatz zu *B. subtilis* (siehe Kapitel 6.2), keine natürliche Kompetenz und ist dementsprechend genetisch schwer zugänglich. In diesem Stamm ist zwar die Unterbrechung von Genen mit Hilfe einer Protoplasten-Transformation beschrieben worden, jedoch konnte eine genetische Manipulation zum Modulaustausch innerhalb des nichtribosomalen Biosynthese-Genclusters bislang nicht realisiert werden [Konz *et al.*, 1997; Neumüller *et al.*, 2001].

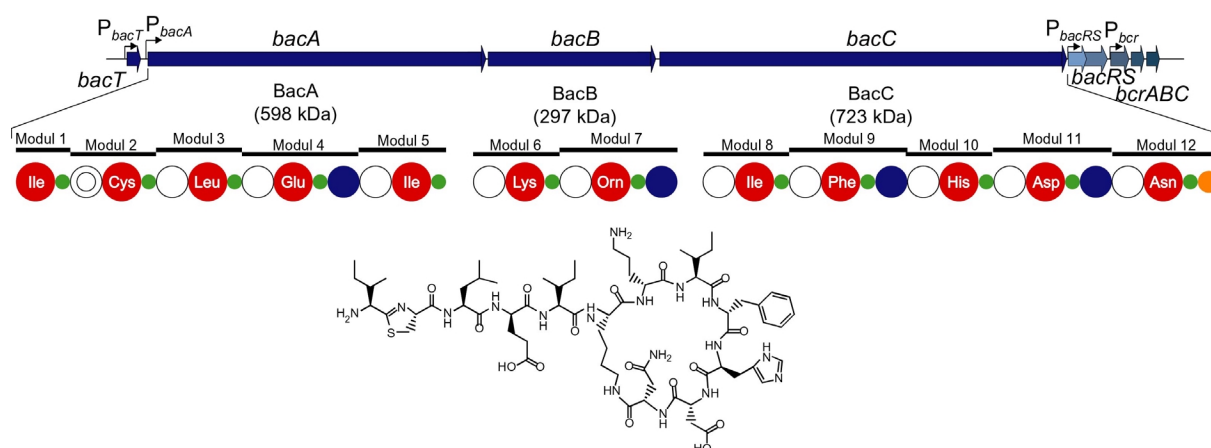


Abb. 7.1: Das Bacitracin-Biosynthese-Gencluster

Gezeigt ist die chromosomale Region des Bacitracin-Biosynthese-Genclusters (*bac*) von *B. licheniformis* ATCC 10716 mit den Genen *bacTABCRS* und *bcrABC*. Die drei Peptidsynthetasen BacABC katalysieren die Bildung des Peptidantibiotikums. BacT stellt die TypII-Thioesterase dieses Systems dar. Die Ausbildung einer Resistenz gegen das Peptidantibiotikum Bacitracin erfolgt unter Verwendung des Zwei-Komponenten-Systems BacRS und des Bacitracin-spezifischen ABC-Transporters BcrABC.

Um dennoch das Bacitracin-Biosynthese-System für gezielte Veränderungen zugänglich zu machen, sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit ein heterologes Expressionssystem für den 49kb-umfassenden Genkluster konstruiert werden. Am Beispiel der im vorangegangenen Kapitel vorgestellten Produktion der artifiziellen, dimodularen Hybridsynthetase $C_{srfA-A1}-(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)_{srfA-B2-3}$ konnte gezeigt werden, dass der native NRP-Produzent *B. subtilis* einen exzellenten Wirt für die heterologe Expression von NRPS-Genen darstellt (siehe Kapitel 6, diese Arbeit). Während bei der Verwendung des heterologen Wirts *E. coli* die Degradation einer dimodularen Hybridsynthetase beobachtet wurde, waren die *B. subtilis*-Stämme KE90 und SD10 in der Lage, das analoge Protein in stabiler, löslicher Form zu produzieren. Weiterhin war die *B. subtilis*-inhärente PPTase Sfp in der Lage, die Konvertierung der NRPSs von ihrer inaktiven apo-Form in die aktive holo-Form zu katalysieren.

Einen Nachteil von *B. subtilis* stellt jedoch die bekannte Instabilität von Plasmiden in diesem Wirt dar, die eine zeitaufwendige Integration der zu exprimierenden DNA-Fragmente in das Chromosom von *B. subtilis* erforderlich macht [Bron *et al.*, 1991; Ehrlich *et al.*, 1986]. Um hierbei eine Expansion des Chromosoms bei der Integration des 49kb-umfassenden Bacitracin-Biosynthese-Genklusters zu minimieren, wurde wiederum das Derivat *B. subtilis* KE30 verwendet [Eppelmann *et al.*, 2001], welches die Deletion des *B. subtilis* inhärenten, 26kb-umfassenden Surfactin-Biosynthese-Operon trägt. Auf diese Weise konnte die resultierende Vergrößerung des *Bacillus*-Chromosoms von 1,1% auf 0,5% verringert werden.

7.2 Integration des 49kb-umfassenden Bacitracin-Biosynthese-Genklusters in die ehemalige *srfA*-Region von *B. subtilis*

Um eine effiziente Produktion des Peptidantibiotikums in einem Bacitracin-resistenten Wirt zu gewährleisten, wurde bei der Konstruktion des heterologen Expressionssystems darauf geachtet, dass neben den drei Biosynthese-Genen *bacABC* [Konz *et al.*, 1997], welche für die drei Bacitracin-Synthetasen BacABC kodieren, ebenfalls die assoziierten ORFs integriert wurden (siehe Abb. 7.1). Stromaufwärts des Bacitracin-Biosynthese-Operons liegt *bacT*, welches für die TypII-Thioesterase dieses Systems kodiert. Für diese Klasse von *cleaning enzymes* konnte ein positiver Einfluss auf die Produktivität der NRP-Bildung nachgewiesen werden [Schneider & Marahiel, 1998]. Stromabwärts von *bacABC* konnten die Gene zur

Ausbildung der Bacitracin-Selbst-Resistenz determiniert werden [Neumüller *et al.*, 2001], wobei *bacRS* für ein Zwei-Komponenten-System und *bcrABC* für den Bacitracin-spezifischen ABC-Transporter kodieren. Die Integration des vollständigen, 49kb-umfassenden Bacitracin-Biosynthese-Genklusters unter der transkriptionellen Kontrolle der nativen Promotoren (P_{bacT} , P_{bacA} , P_{bacRS} und P_{brc}) erfolgte, wie nachfolgend dargestellt, in zwei Hauptschritten.

7.2.1 Integration von *bacT* und *bacA* in *B. subtilis* KE30

Im ersten Schritt wurde zunächst die 24kb-umfassende 5'-Region des Bacitracin-Biosynthese-Genklusters in die ehemalige *srfA*-Region von *B. subtilis* integriert. Das verwendete Fragment enthielt *bacT*, *bacA* und einem Teil des *bacB*-Gens (siehe Abb. 7.2). Für die Integration wurden zuerst kleine 5' und 3' homologe Regionen des entsprechenden 24kb-DNA-Fragmentes mittels PCR amplifiziert und in die ehemalige *srfA*-Region von *B. subtilis* eingeführt. Anschließend erfolgte die eigentliche Integration des vollständigen DNA-Bereiches mittels Transformation des neu generierten *B. subtilis*-Stammes KE310 mit chromosomaler DNA von *B. licheniformis*. Auf diese Weise musste nicht das gesamte 24kb-umfassende DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert werden, wodurch die mögliche Einführung von Mutationen weitestgehend ausgeschlossen werden konnte.

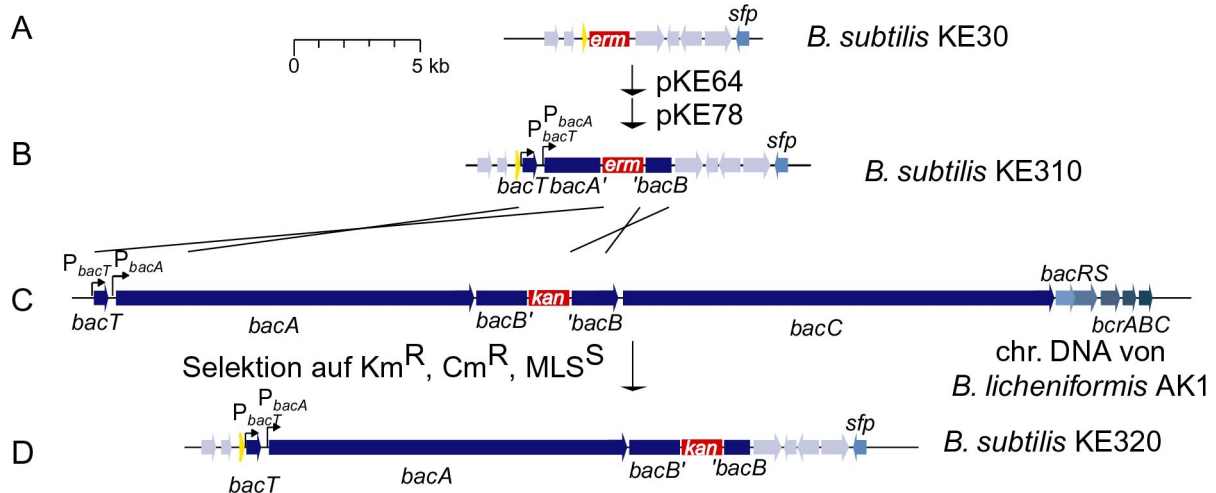


Abb. 7.2: Integration von *bacT*, *bacA* und *bacB1* in *B. subtilis* KE30

Schematisches Diagramm der Konstruktion von *B. subtilis* KE320. In die ehemalige *srfA*-Region von *B. subtilis* (A) wurden durch Transformation mit pKE64 und pKE78 die 5' und 3' homologen Regionen *bacTA'* bzw. *bacB'* über Rekombination integriert (B). Der erhaltene *B. subtilis* Stamm KE310 wurde anschließend mit chromosomaler DNA aus *B. licheniformis* AK1 (C) transformiert. Durch homologe Rekombination erfolgte die chromosomale Integration von *bacT*, *bacA* und *bacB1* (24 kb). Der resultierende *B. subtilis*-Stamm wurde KE320 genannt (D).

Die Integration der kurzen DNA-Fragmente *bacT* (1 kb) und *bacB2* (1,1 kb) des Bacitracin-Biosynthese-Operons in die ehemalige *srfA*-Region von *B. subtilis*

erfolgte über homologe Rekombination mit dem Integrationsplasmid pKE64. Dieses Plasmid enthält die 5' (*yckGH*, 2,5 kb) und 3' (*ycxA'*, 0,9 kb) homologen Regionen von *srfA* für die Integration in das Chromosom von *B. subtilis* KE30. Innerhalb dieser Regionen liegen die genannten, kurzen DNA-Fragmente des *bac*-Operons, welche durch den Resistenz-Marker *kan* getrennt werden. Bei der Transformation von *B. subtilis* KE30 mit dem linearisierten Integrationsplasmid pKE64 konnten Km/Cm-resistente Klone erhalten werden, die nachfolgend auf den Verlust ihrer MLS-Resistenz untersucht wurden. Die korrekte Integration der kurzen DNA-Fragmente *bacT* und *bacB2* in das Chromosom des erhaltenen *B. subtilis* Stammes KE300 wurde mittels Southern-Blot analysiert (Daten nicht gezeigt). Anschließend erfolgte die Verlängerung des 5'-Bereiches (*bacT*; 1 kb) durch Transformation von *B. subtilis* KE300 mit dem Integrationsplasmid pKE78. Dieses Plasmid beinhaltet den verlängerten 5' homologen Bereich *bacTA'* (3,1 kb) sowie den 3' homologen Bereich *bacB2-ycxA'* (2 kb) für die Integration in *B. subtilis* KE300, welche durch den selektierbaren Marker *erm* voneinander getrennt werden. Bei der Transformation von *B. subtilis* KE300 mit dem linearisierten Integrationsplasmid pKE78 konnten MLS/Cm-resistente Klone erhalten werden, die nachfolgend auf den Verlust ihrer Km-Resistenz untersucht wurden. Die Verifizierung der Verlängerung des 5' homologen Bereiches *bacTA'* in dem erhaltenen Stamm *B. subtilis* KE310 (siehe Abb. 7.2B) erfolgte mittels Southern-Blot-Analyse (Daten nicht gezeigt).

Die Integration der vollständigen 24kb-umfassenden 5' Region des Bacitracin-Biosynthese-Genklusters erfolgte durch Transformation des *B. subtilis* Derivates KE310 mit chromosomaler DNA von *B. licheniformis* AK1 (siehe Abb. 7.2C) [Konz *et al.*, 1997]. In diesem Stamm ist *bacB* stromabwärts des ersten Moduls durch den selektierbaren Marker *kan* unterbrochen, wodurch eine positive Selektion auf die Integration ermöglicht wurde. Nach der Transformation konnten Km/Cm-resistente Klone erhalten werden, die nachfolgend auf den Verlust ihrer MLS-Resistenz untersucht wurden. Die korrekte Integration des 24kb-umfassenden DNA-Bereiches wurde mittels Southern-Blot verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Der resultierende *B. subtilis* Stamm KE320 trägt den 5'-Bereich des Bacitracin-Biosynthese-Operons unter der Kontrolle des vegetativen σ^A -Promotors, und sollte aufgrund dieser Organisation in der Lage sein die Bacitacin-Synthetase A (598 kDa) am Übergang der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase zu produzieren. Entsprechende Expressionsstudien bestätigten diese Annahme und

zeigten, dass der konstruierte Stamm *B. subtilis* KE320 im Vergleich zum nativen Bacitracin-Produzenten *B. licheniformis* ATCC 10716 zu einer weitaus effizienteren Produktion von BacA befähigt war (siehe Abb. 7.3).

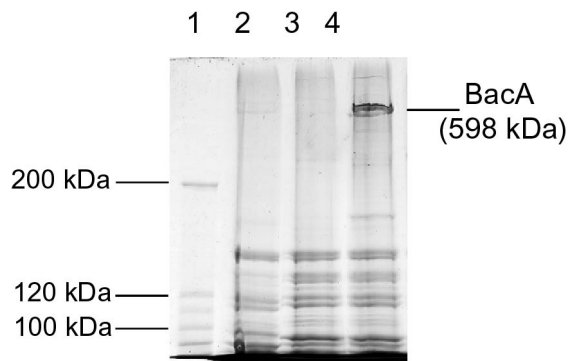


Abb. 7.3: Heterologe Expression von *bacA* in *B. subtilis* KE320

Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, welches die Produktion der Bacitracin-Synthetase A am Übergang der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase zeigt. In Bahn 1 ist der Proteinmarker, in Bahn 2 der Gesamtzellextrakt des nativen Bacitracin-Produzentenstammes *B. licheniformis* ATCC 10716, in Bahn 3 der Gesamtzellextrakt des *srfA*-Deletionsstammes *B. subtilis* KE30 und in Bahn 4 der Gesamtzellextrakt des *BacA*-Produzentenstammes *B. subtilis* KE320 gezeigt.

7.2.2 Reinigung und biochemische Charakterisierung von BacA aus *B. subtilis* KE320

Für die biochemische Charakterisierung des heterolog überproduzierten BacA-Proteins (598 kDa) aus *B. subtilis* KE320 erfolgte eine partielle Reinigung der Peptidsynthetase mittels Ammoniumsulfat-Fällung und Molekularsieb-Chromatographie (siehe Abb. 7.4A).

Zur Charakterisierung der Substrat-Selektivität von BacA wurden die Aminosäure-abhängigen ATP/Pyrophosphat-Austauschreaktionen durchgeführt. Da es sich bei der gereinigten Probe jedoch um keine homogene Lösung, sondern ein Proteingemisch handelte, konnten zusätzliche Aktivitäten - verursacht durch die vorhandenen Proteinverunreinigungen - nicht ausgeschlossen werden. So könnten z. B. neben NRPSs auch tRNA-Synthetasen Aminosäuren unter Verbrauch von ATP zum korrespondierenden Aminoacyl-Adenylat aktivieren. Frühere Arbeiten zeigten jedoch, dass nur NRPSs in der Lage sind dATP anstelle von ATP für die Aminosäure-Aktivierung zu verwenden, während das Desoxynukleotid kein Substrat für die tRNA-Synthetasen darstellt. Somit konnten durch die Verwendung von dATP im ATP/Pyrophosphat-Austausch Nebenreaktionen der tRNA-Synthetasen ausgeschlossen werden.

Für das heterolog produzierte und gereinigte Protein BacA aus *B. subtilis* KE320 konnte auf diese Weise eine spezifische Aktivierung der kognaten Aminosäuren L-Ile (100%), L-Cys (27%) und L-Leu (32%) beobachtet werden (siehe Abb. 7.4B). Für die Substrat-Aminosäure L-Glu (0,5%) konnte hingegen keine spezifische

Aktivierung detektiert werden. Diese Ergebnisse korrelieren jedoch mit den Daten, die für das Wildtyp-Protein aus dem Bacitracin Produzenten *B. licheniformis* ATCC 10716 ermittelt wurden [Ishihara & Shimura, 1974]. Als Negativkontrolle diente die mis-kognate Aminosäure L-Pro, für die ebenfalls keine signifikante Aktivierung (0,8%) beobachtet wurde. Die erhöhte Aktivität für L-Ile lässt sich auf die Anwesenheit von zwei L-Ile-selektiven A-Domänen zurückführen, während jeweils nur eine L-Cys- und L-Leu-spezifische A-Domäne in BacA enthalten sind (siehe Abb. 7.1).

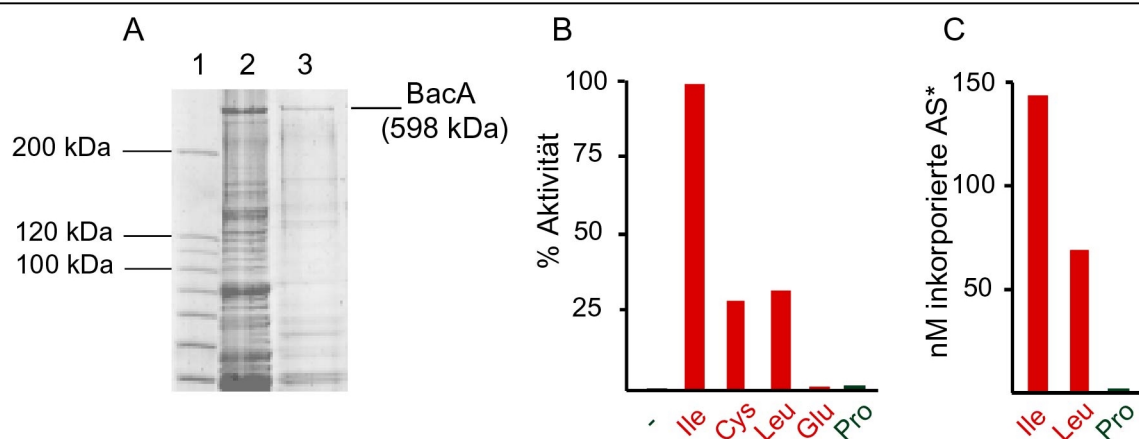


Abb. 7.4: Reinigung und biochemische Charakterisierung von BacA aus *B. subtilis* KE320

(A) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, welches die Reinigung von BacA zeigt. In Bahn 1 ist der Proteinmarker, in Bahn 2 die Proteine nach 35%iger $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung und in Bahn 3 die Proteine nach Molekularsieb-Chromatographie gezeigt. (B) Bestimmung der Substrat-Selektivität von BacA mittels ATP/ PP_i -Austauschreaktionen. BacA zeigt eine spezifische Aktivierung der kognaten (rot) Aminosäuren L-Ile, L-Cys und L-Leu. Keine Aktivität konnte für die kognate Aminosäure L-Glu (rot), sowie für die mis-kognate Aminosäure L-Pro (grün) beobachtet werden. Die höchste Aktivierungsrate (für L-Ile) wurde auf 100% gesetzt. (C) Bei der Untersuchung der kovalenten Beladung des Proteins mit radioaktiv markierten Aminosäuren konnte eine selektive Inkorporation der kognaten Aminosäuren L-[^{14}C]-Ile und L-[^{14}C]-Cys (rot) in das Protein beobachtet werden. Eine Beladung des Proteins mit der mis-kognaten Aminosäure L-[^{14}C]-Pro (grün) wurde nicht beobachtet.

Die Untersuchung der posttranslationalen Modifikation der PCP-Domänen mit dem Ko-Faktor Ppant erfolgte mittels der Beladung von BacA mit radioaktiv-markierten Substrat-Aminosäuren. Hierbei konnte eine spezifische Thioester-Bildung für die kognaten Aminosäuren L-[^{14}C]-Ile (140 nM) und L-[^{14}C]-Leu (60 nM) beobachtet werden (siehe Abb. 7.4C). Bei Verwendung der mis-kognaten Aminosäure L-[^{14}C]-Pro wurde hingegen keine Inkorporation von Radioaktivität determiniert. Die inhärente PPTase Sfp aus *B. subtilis* KE320 ist somit offensichtlich in der Lage, das heterolog produzierte Protein BacA in die aktive, phosphopantetheinylierte holo-Form zu überführen. Die um den Faktor 2,3 erhöhte Inkorporation von L-[^{14}C]-Ile im Vergleich zu L-[^{14}C]-Leu lässt sich wiederum auf die Anwesenheit von zwei L-Ile-selektiven Modulen zurückführen, während nur ein L-Leu-selektives Modul in BacA enthalten ist (siehe Abb 7.1).

7.2.3 Integration von *bacB*, *bacC* und *bcrABC* in *B. subtilis* KE320

Im zweiten Schritt erfolgte die Integration der 30kb-umfassenden 3'-Region des Bacitracin-Biosynthese-Genklusters in das Chromosom von *B. subtilis* KE320. Dieses Fragment enthielt die Gene '*bacB*, *bacC* und *bcrABC*, sowie die durch eine Kanamycin-Resistenz-Kassette unterbrochenen Gene *bacRS* (siehe Abb. 7.5).

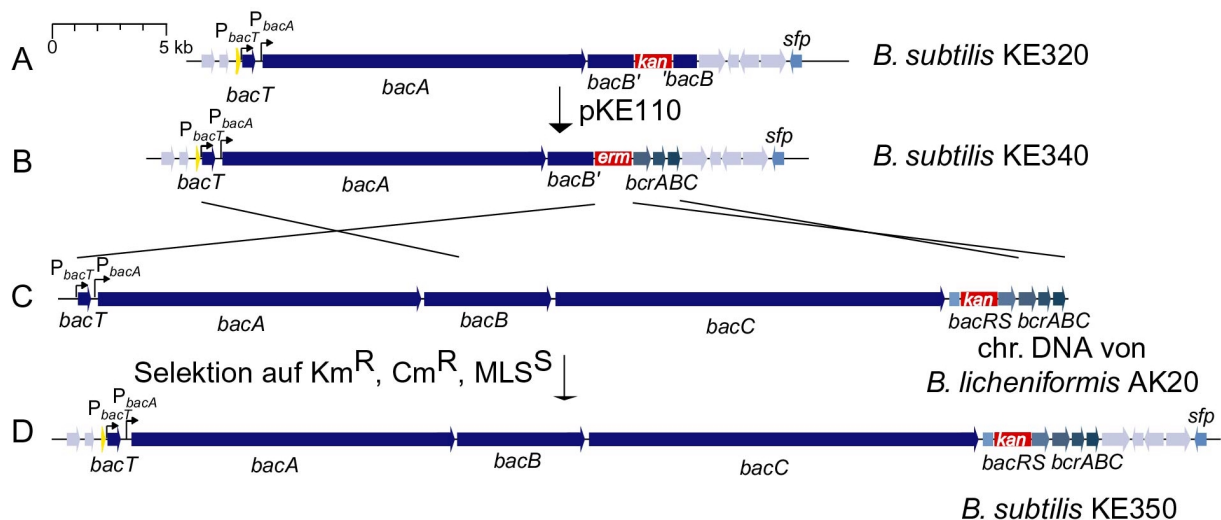


Abb. 7.5: Integration des vollständigen *bac*-Biosynthese-Genklusters in *B. subtilis* KE320

Schematisches Diagramm der Vervollständigung des 49 kb umfassenden *bac*-Biosynthese-Genklusters in *B. subtilis* KE320. In das Chromosom des BacA-Produzentenstammes *B. subtilis* KE320 (A) wurde durch Transformation mit pKE110 die 3' homologe Region *bcrABC* integriert (B). Der erhaltene *B. subtilis* Stamm KE340 wurde anschließend mit chromosomaler DNA aus *B. licheniformis* AK20 (C) transformiert. Hierbei konnte der Stamm *B. subtilis* KE350 erhalten werden, welcher die chromosomale Integration des vollständigen *bacRS*-unterbrochenem *bac*-Biosynthese-Genklusters trägt (D).

Im ersten Transformationsschritt wurde der 3' homologe Bereich *bcrABC* (2,2 kb) des Bacitracin-Biosynthese-Genklusters in das Chromosom von *B. subtilis* KE320 integriert. Das Integrationsplasmid pKE110 enthielt die homologen Bereiche *bacB1* (2,0 kb) und *ycxA'* (0,9 kb) für die Rekombination in das Chromosom, welche durch den selektierbaren Marker *erm* und *bcrABC* voneinander getrennt vorliegen. Bei der Transformation von *B. subtilis* KE320 mit dem linearisierten Plasmid pKE110 konnten MLS/Cm-resistente und Km-sensitive Klone erhalten werden. Die Verifizierung des resultierenden Stammes KE340 erfolgte mittels Southern-Blot-Analyse (Daten nicht gezeigt). Demnach enthält *B. subtilis* KE340 den 20,6kb-umfassenden 5' Bereich *bacTAB1*, sowie den kurzen 3' Bereich *bcrABC* (2,2 kb) in der ehemaligen *srfA*-Region des Chromosoms (siehe Abb. 7.5B). Die Integration der vollständigen 3' Region des Bacitracin-Biosynthese-Genklusters erfolgte mittels Transformation mit chromosomaler DNA aus *B. licheniformis* AK20, welche den selektierbaren Marker

kan im unterbrochenen Genkluster des Zwei-Komponentensystems BacRS trägt (siehe Abb. 7.5C). Entsprechende Transformanten wurden auf Km- und Cm-Resistenz, sowie MLS-Sensitivität untersucht. Die korrekte Integration des 30kb-umfassenden DNA-Fragmentes wurde nachfolgend mittels Southern-Blot-Analyse verifiziert (Daten nicht gezeigt). Der erhaltene Stamm, welcher die Gene *bacTABC* und *bcrABC* im Chromosom trägt, wurde *B. subtilis* KE350 genannt (siehe Abb. 7.5D).

Die Produktion der drei Peptidsynthetasen BacA (598 kDa), BacB (297 kDa) und BacC (723 kDa) am Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase konnte mittels SDS-PAGE-Analyse gezeigt werden (siehe Abb. 7.6A). Erneut konnte im Vergleich zum nativen Produzentenstamm *B. licheniformis* ATCC 10716 eine verstärkte Produktion der Bacitracin-Synthetasen im heterologen Wirt *B. subtilis* KE350 beobachtet werden.

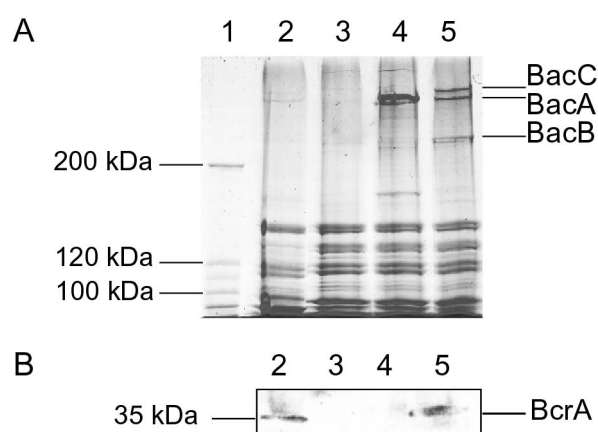


Abb. 7.6: Heterologe Expression von *bacABC* und *bcrABC* in *B. subtilis* KE350

(A) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, welches die Produktion der Bacitracin-Synthetasen ABC am Wachstumsphasenübergang zeigt. (B) Western-Blot-Analyse der BcrA-Produktion. In Bahn 1 ist der Proteinmarker gezeigt. In den weiteren Bahnen sind die Gesamtzellextrakte des nativen Bacitracin-Produzentenstammes *B. licheniformis* ATCC 10716 (Bahn 2), des *srfA*-Deletionsstammes *B. subtilis* KE30 (Bahn 3), des BacA-Produzentenstammes *B. subtilis* KE320 (Bahn 4), sowie des BacABC und BcrABC-Produzentenstammes *B. subtilis* KE320 gezeigt.

Anhand von Western-Blot-Analysen mit spezifischen anti-BcrA-Antikörper konnte gezeigt werden, dass der Bacitracin-selektive ABC-Transporter BcrABC (34,5, 23,3 und 23,1 kDa) ebenfalls in *B. subtilis* KE350 heterolog produziert wird (siehe Abb. 7.6B). In den Gesamtzellextrakten des nativen Bacitracin-Produzentenstammes *B. licheniformis* ATCC 10716, sowie *B. subtilis* KE350 konnte eine entsprechende Reaktion des Antikörpers nachgewiesen werden, die in den Negativkontrollen von *B. subtilis* KE30 und KE320 fehlt.

7.2.4 Rekonstitution des Zwei-Komponentensystems *bacRS*

In früheren Untersuchungen konnte der positive Einfluss des Zwei-Komponenten-Systems BacRS auf die Expression der Gene des ABC-Transporters

BcrABC im Bacitracin-Produzenten *B. licheniformis* ATCC 10716 gezeigt werden [Neumüller *et al.*, 2001]. Aus diesem Grund sollte auch der Gencluster *bacRS*, welcher natürlicherweise stromabwärts des Bacitracin-Biosynthese-Operons lokalisiert ist, im heterologen Wirt *B. subtilis* KE350 rekonstituiert werden (siehe Abb. 7.7).

In einem Marker-Austausch-Experiment wurde *B. subtilis* KE350 parallel mit chromosomaler DNA des Wildtyp-Bacitracin-Produzenten *B. licheniformis* ATCC 10716 und dem selbst-replizierenden Helferplasmid pCm::Tc transformiert, welches den selektierbaren Marker *tet* trägt. Hierbei konnten Tc/Cm-resistente Transformanten erhalten werden, die nachfolgend auf den Verlust ihrer Km-Resistenz untersucht wurden (*B. subtilis* KE355, siehe Abb. 7.7). Nach dem Verlust des selbst-replizierenden Plasmides pCm::Tc konnte der nunmehr Cm-resistente und Tc/Km-sensitive Stamm *B. subtilis* KE360 erhalten werden (siehe Abb. 7.7C). Die Verifizierung der Rekonstitution von *bacRS* in *B. subtilis* KE360 erfolgte mittels Southern-Blot-Analyse (Daten nicht gezeigt). Dieser Stamm enthält die chromosomale Integration des vollständigen Bacitracin-Biosynthese-Genclusters in der ehemaligen *srfA*-Region des *B. subtilis* Chromosoms.

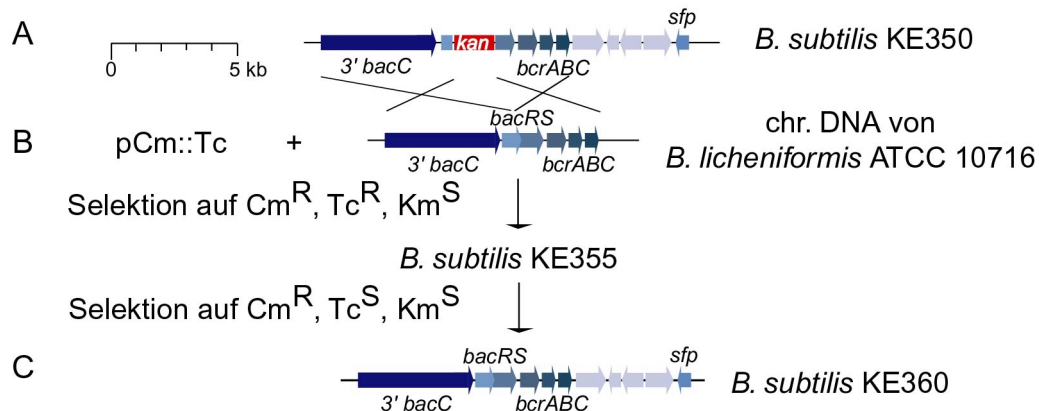


Abb. 7.7: Rekonstitution von *bacRS* in *B. subtilis* KE350

In A) ist die 3' Region des *bac*-Biosynthese-Genclusters im Chromosom von *B. subtilis* KE350 gezeigt. Die Transformation von *B. subtilis* KE350 mit chromosomaler DNA von *B. licheniformis* ATCC 10716 und dem Helferplasmid pCm::Tc führte zur Rekonstitution des Zwei-Komponentensystems *bacRS* in *B. subtilis* KE355. Nach Verlust des Helferplasmides konnte der Tc-sensitive Stamm *B. subtilis* KE360 erhalten werden.

Mittels SDS-PAGE-Analyse konnte die Produktion der drei Bacitracin-Synthetasen BacABC am Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase detektiert werden (siehe Abb. 7.8A). Im Vergleich mit dem nativen Produzentenstamm *B. licheniformis* ATCC 10716, wird in den heterologen Wirten *B. subtilis* KE350 und KE360 eine verstärkte Expression des Bacitracin-Biosynthese-Operons beobachtet. Anhand von Western-Blot-Analysen mit anti-BacR-Antikörper

konnte die Produktion des Zwei-Komponentensystems BacRS (27,4 und 39,5 kDa) in *B. subtilis* KE360 gezeigt werden. In den Gesamtzellextrakten des nativen Bacitracin-Produzenten *B. licheniformis* ATCC 10716 und *B. subtilis* KE360 konnte eine entsprechende Reaktion des Antikörpers nachgewiesen werden, während in den Kontrollen *B. subtilis* KE30, KE320 und KE350 erwartungsgemäß kein Response-Regulator (BacR) detektiert wurde (siehe Abb. 7.8B).

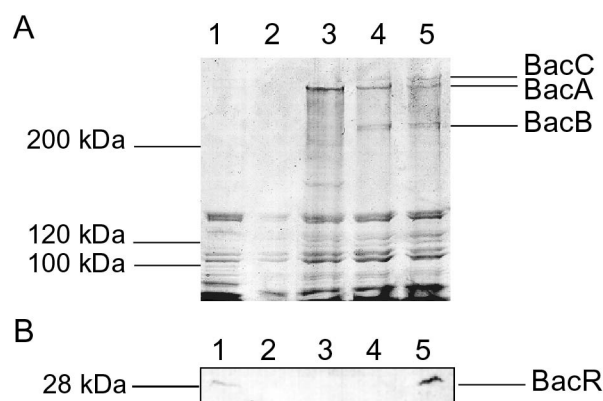


Abb. 7.8: Heterologe Expression von *bacABCRS* in *B. subtilis* KE360

(A) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, welches die Produktion der Bacitracin-Synthetasen am Übergang zum stationären Wachstum zeigt. In den Bahnen sind die Gesamtzellextrakte von *B. licheniformis* ATCC 10716 (Bahn 1), *B. subtilis* KE30 (Bahn 2), *B. subtilis* KE320 (Bahn 3), *B. subtilis* KE350, sowie *B. subtilis* KE360 gezeigt. In (B) ist Western-Blot-Analyse mit anti-BacR-Antikörper gezeigt.

7.2.5 Heterologe Produktion des Peptidantibiotikums Bacitracin in *B. subtilis* KE360

Das Peptidantibiotikum Bacitracin stellt ein Gemisch aus 15 verschiedenen, zyklischen Dodecapeptiden dar, die gleichzeitig in *B. licheniformis* ATCC 10716 produziert werden [Ikai *et al.*, 1992]. Bei der Hauptkomponente handelt es sich um Bacitracin A, welches einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von Gram-positiven Bakterien ausübt. Durch die Desaminierung des N-terminalen Amids (zum Keton) und Oxidation des Thiazolin-Rings (zum korrespondierenden Thiazol) kommt es zur degradativen Bildung von Bacitracin F, welches eine nierentoxische Aktivität besitzt. Die Strukturen der Bacitracine A und F unterscheiden sich also am N-Terminus, welcher von den Aminosäuren L-Ile und L-Cys gebildet wird (siehe Abb. 7.9). Die Strukturen der 13 weiteren Derivate ähneln den beiden Bacitracinen A und F, jedoch ist hier ein Austausch von bis zu drei L-Ile bzw. L-Leu-Resten gegen L-Val an den Positionen 3, 5 und 8 des Peptidproduktes zu beobachten.

Bacitracin wird üblicherweise durch Fermentation des *B. licheniformis* Produzentenstammes ATCC 10716 in M20-Medium gewonnen. In einem Vorversuch konnte jedoch gezeigt werden, dass der heterologe Wirt *B. subtilis* nicht in der Lage ist in diesem Medium zu wachsen (Daten nicht gezeigt). Daher musste zunächst, in

einer ersten Versuchsreihe, ein neues Bacitracin-Produktions-Medium für *B. subtilis* gefunden werden. Hierfür wurden die *B. subtilis* Stämme KE30 und KE360, sowie der native Bacitracin-Produzent *B. licheniformis* ATCC 10716 in den Vollmedien 2xYT und DSM fermentiert, und die Kulturüberstände mit n-Butanol extrahiert. Die Analyse der Extrakte erfolgte über ein Bioassay anhand der antibiotischen Aktivität von Bacitracin A gegen das Gram-positive Bakterium *Micrococcus luteus* (siehe Abb. 7.9). Hierfür wurden jeweils 10 µL der buthanolischen Extrakte sowie eines Bacitracin-Standards (1 mg/mL) auf *Micrococcus luteus* Overlay-Platten aufgetragen und 12 h bei 37 °C inkubiert.

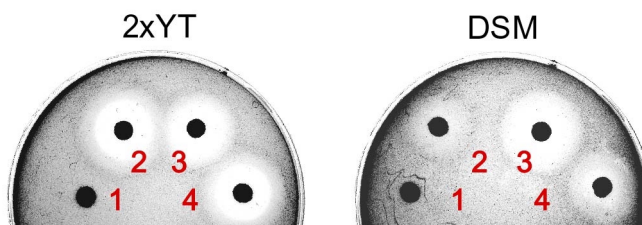


Abb. 7.9: Medien-abhängige Bacitracin-Produktion

Gezeigt ist die Analyse der Bacitracin-Produktion in 2xYT-Medium (links) sowie DSM (rechts). Auf die *M. luteus* Overlay-Platten wurden je 10 µL eines Bacitracin-Standard (3) sowie der buthanolischen Extrakten von *B. subtilis* KE30 (1), KE360 (2) und *B. licheniformis* ATCC 10716 (4) aufgetragen.

Wie in Abb. 7.9 gezeigt, hängt die Produktion des Peptidantibiotikums Bacitracin in *B. subtilis* KE360 (2) und *B. licheniformis* ATCC 10716 (4) stark vom verwendeten Fermentationsmedium ab. Während die entsprechenden Extrakte aus DSM eine vergleichsweise geringe antibiotische Wirkung zeigten, wurde das Wachstum von *M. luteus* von den 2xYT-Extrakten deutlich stärker inhibiert. Mit den Extrakten des *srfA*-Deletionsstammes *B. subtilis* KE30 (1), welcher nicht in der Lage ist Bacitracin zu produzieren, konnte erwartungsgemäß keine Bioaktivität beobachtet werden.

Zur Charakterisierung des produzierten Peptidantibiotikums im heterologen Wirt *B. subtilis*, wurden die Bacitracin-Produzenten *B. subtilis* KE360 und *B. licheniformis* ATCC 10716 in dem neuen Produktions-Medium 2xYT fermentiert. Die Kulturüberstände wurden mit n-Butanol extrahiert und mittels HPLC/MS analysiert (siehe Abb. 7.9). Als Negativkontrolle dienten wiederum entsprechende Extrakte des *srfA*-Deletionsstammes *B. subtilis* KE30 (Daten nicht gezeigt).

Wie in Abb. 7.10 gezeigt, produzieren der heterologe Wirt *B. subtilis* KE360 und der native Produzentstamm *B. licheniformis* ATCC 10716 ein Gemisch des

zyklisch-verzweigten Bacitracins mit den Hauptkomponenten Bacitracin A (bei einer Retentionszeit von 36,5 min: $[M+H] = 1422,9$ m/z; $[M+2H] = 712,2$ m/z) und dem Oxidationsprodukt Bacitracin F (bei 58,0 min: $[M+H] = 1419,9$ m/z; $[M+2H] = 710,2$ m/z). Die 13 weiteren Bacitracin-Derivate konnten aufgrund ihrer geringeren Konzentration nicht nachgewiesen werden.

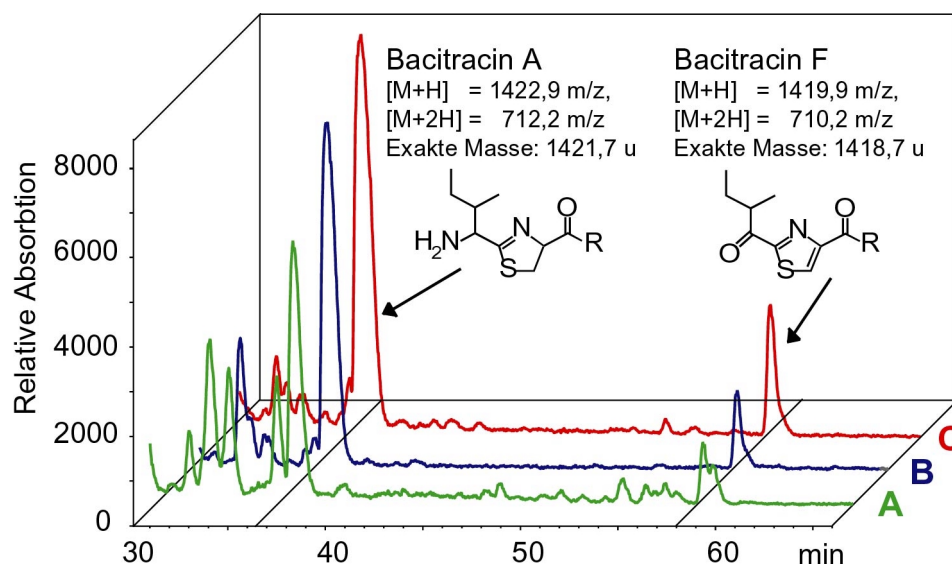


Abb. 7.10: HPLC/MS Analyse der produzierten Bacitracin-Derivate

HPLC/MS-Diagram, welches die produzierten Bacitracin-Derivate in *B. licheniformis* ATCC 10716 (B, blau) und *B. subtilis* KE360 (C, rot) im Vergleich zum kommerziell-erhältlichen Bacitracin Standard (A, grün) zeigt.

Aufgrund der undefinierten Zusammensetzung des kommerziell-erhältlichen Standards (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), sowie der Oxidationsinstabilität von Bacitracin A erfolgte die Quantifizierung des produzierten zyklisch-verzweigten Dodecapeptides anhand der antibiotischen Aktivität von Bacitracin A gegen *Micrococcus luteus*. Hierfür wurden Verdünnungsreihen der Extrakte von *B. subtilis* KE360 und *B. licheniformis* ATCC 10716, sowie des kommerziell-erhältlichen Bacitracin-Standards auf *M. luteus* Overlay-Platten aufgetragen. Nach 12-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Größe der Hemmhöfe vermessen und miteinander verglichen. Für den konstruierten *B. subtilis*-Stamm KE360 konnte in 2xYT-Medium eine Bacitracin A Produktion von 8400 IU/L gemessen werden (siehe Tab. 7.1). Im Vergleich zum Wildtyp-Produzenten *B. licheniformis* ATCC 10716 (5600 IU/L) bedeutete dies eine 50%-ige Erhöhung der Bacitracin A-Produktion im heterologen Wirt *B. subtilis*.

7.2.6 Bacitracin-Resistenz von *B. subtilis* KE360

Aufgrund der Sensitivität des Gram-positiven Bakteriums *B. subtilis* gegen das Peptidantibiotikum Bacitracin, wurden neben dem eigentlichen Biosynthese-Operon auch die Resistenz-vermittelnden Gene des ABC-Transporters BcrABC, sowie die Gene des ihn regulierenden Zwei-Komponentensystems BacRS in das Chromosom von *B. subtilis* KE360 integriert. Nachdem die Produktion dieser Proteine mittels Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 7.2.3+4), sollte deren Einfluss auf die Bacitracin-Resistenz im heterologen Wirt ermittelt werden (siehe Tab. 7.1). Da das Peptidantibiotikum Bacitracin die Zellwand-Biosynthese und somit das Wachstum der Zellen inhibiert, wurden exponentiell-wachsende Zellen der Stämme *B. subtilis* KE30 und KE360, sowie des nativen Produzenten *B. licheniformis* ATCC 10716 einem Bacitracin-Stress von 7-700 IU/mL ausgesetzt. Während beim *srfA*-Deletionsstamm und Ausgangskonstrukt *B. subtilis* KE30 eine Inhibition des Zellwachstums bereits bei 20 IU/mL beobachtet werden konnte, zeigte der Bacitracin-, BacRS- und BcrABC-Produzent *B. subtilis* KE360 eine um den Faktor 14 erhöhte Resistenz gegen das produzierte Peptidantibiotikum. Die gemessene Bacitracin-Resistenz war hierbei vergleichbar mit der des nativen Produzentenstammes. Sowohl für *B. licheniformis* ATCC 10716, als auch *B. subtilis* KE360 konnte eine Inhibition des Wachstums erst oberhalb einer Bacitracin-Konzentration von 280 IU/mL beobachtet werden.

Tab. 7.1: Bacitracin-Produktion und -Resistenz

Stamm	Produzierte Enzyme	Bacitracin Quantifizierung ^a	Bacitracin Qualität	Bacitracin Resistenz
<i>B. licheniformis</i>	BacTABC			
ATCC 10716	BacRS BcrABC	5600 IU/L	Bacitracin A 93% Bacitracin F 7%	280 IU/mL
<i>B. subtilis</i> KE30	-	-	-	20 IU/mL
<i>B. subtilis</i> KE360	BacTABC BacRS BcrABC	8400 IU/L	Bacitracin A 87% Bacitracin F 13%	280 IU/mL

^a70 IU = 1 mg des kommerziell-erhältlichen Bacitracin-Standards von Sigma, Deisenhofen, Deutschland

8 Diskussion

Die Bildung von nichtribosomalen Peptiden wird an multifunktionellen Proteintemplaten, den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPSs), katalysiert. Aufgrund der modularen Architektur dieser Enzyme, wird die Möglichkeit zur gezielten Veränderung der Proteintemplate zum rationalen Design von neuen Peptidantibiotika eröffnet. So konnte bereits am Beispiel des Surfactin-Biosynthesesystems gezeigt werden, dass durch den Austausch einzelner Domänen sowie vollständiger Module neue Derivate des Lipoheptapeptides erzeugt werden können [Schneider *et al.*, 1998; Stachelhaus *et al.*, 1995; Yakimov *et al.*, 2000]. Die genannten Methoden sind jedoch mit drastischen Eingriffen in die Struktur der multimodularen Proteintemplate verbunden, so dass Störungen in der intermolekularen Kommunikation nicht auszuschließen sind. In der Tat waren die meisten Modul- und Domänen austausche mit Einbußen der Produktivität der Peptidbildung verbunden.

Mit Hilfe des Selektivitäts-vermittelnden Kodes für NRPSs ist es dagegen möglich, durch den Austausch einzelner Aminosäure-Reste die Substrat-Selektivität von vollständigen Modulen sowie Synthetasen gezielt zu verändern [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Bei der Verwendung dieser Methode wird der Eingriff in das Proteintemplat auf einzelne Aminosäure-Reste limitiert, so dass eventuelle Störungen der Tertiärstruktur weitgehend ausgeschlossen werden können. In der vorliegenden Arbeit konnte dieses neue Werkzeug erstmals für die gezielte Veränderung eines nichtribosomalen Proteintemplates *in vivo* etabliert werden [Eppelmann *et al.*, 2002].

Eine Voraussetzung für das rationale Design neuer Peptidantibiotika - egal ob durch Modulaustausch oder Anwendung der nichtribosomalen Kodes - ist die genetische Zugänglichkeit des Wirtes. Für die Manipulation vieler NRPS-Systeme stellt dies einen Engpass dar, da für die meisten NRP-Produzenten keine molekularbiologischen Methoden vorhanden sind. Aus diesem Grund beschränkten sich bislang die Beispiele für gezielte Veränderungen von NRPS-Systemen auf den Surfactin-Biosynthese-Genkluster, dessen natürlicher Produzent, *B. subtilis* ATCC 21332, über eine natürliche Kompetenz und etablierte Methoden zur genetischen Manipulation seines Erbgutes verfügt. In der vorliegenden Arbeit konnte nun die Eignung dieses Wirtes zur heterologen Überproduktion artifizieller NRPSs, sowie vollständiger Biosynthese-Systeme, unter Beweis gestellt werden. Durch die

Konstruktion eines heterologen Expressionssystems für den 49kb-umfassenden Bacitracin-Biosynthese-Gencluster in dem genetisch zugänglichen Wirt *B. subtilis*, steht so ein weiteres NRP-Biosynthese-System für die gezielte Veränderung zur Verfügung.

8.1 Veränderung der Substrat-Selektivität von NRPS A-Domänen *in vitro*

Als Erstes wurde die Veränderung der Substrat-Selektivität von NRPS A-Domänen *in vitro* analysiert. Als Beispiel hierfür dienten die Glutamat- bzw. Aspartat-selektiven A-Domänen des Surfactin-Biosynthese-Systems aus *B. subtilis* ATCC 21332 [Cosmina *et al.*, 1993].

Ziel dieser Untersuchungen war die gezielte Veränderung der Substrat-Selektivität der A-Domänen für die kognaten sauren Aminosäuren zu den korrespondierenden polaren Seitenkettenamiden. Anhand von Homologie-Vergleichen (siehe Abb. 8.1) der L-Glu und L-Gln-aktivierenden A-Domänen von SrfA-A1 bzw. LicA1 konnte postuliert werden, dass sich die beiden Substrat-Bindungstaschen ausschließlich an der Position 239 voneinander unterscheiden. Hierbei kommt es zum Austausch einer basischen (Lys) gegen eine polare (Gln) Seitenkette. Für die L-Asp bzw. L-Asn-aktivierenden A-Domänen von SrfA-B2 und BacC5 wurden hingegen drei differierende Aminosäure-Reste determiniert (Position 299, 322 und 330). Während an den Positionen 299 (Val vs. Ile) und 330 (Ile vs. Val) nur leichte Variationen der aliphatischen Seitenketten beobachtet werden, kommt es an Position 322 zu einer Umkehrung der Ladung, wobei die basische Aminosäure Lys322 gegen die azide Aminosäure Glu ausgetauscht wird.

Positionen											
235	236	239	278	299	301	322	330	331	517		
D	A	K	D	L	G	V	V	D	K	Glu (SrfA-A1)	
D	A	Q	D	L	G	V	V	D	K	Gln (LicA1)	
D	L	T	K	V	G	H	I	G	K	Asp (SrfA-B2)	
D	L	T	K	I	G	E	V	G	K	Asn (BacC5)	

Abb. 8.1: Alignment der Glu/Gln und Asp/Asn-selektiven Bindungstaschen

Gezeigt ist das Alignment der zehn Bindungstaschen-aufbauenden Aminosäuren der L-Glu- (SrfA-A1) und L-Gln- (LicA1) selektiven A-Domänen, sowie der L-Asp- (SrfA-B2) und L-Asn- (BacC5) selektiven A-Domänen. Die Übereinstimmungen der AS sind in rot unterlegt, während Unterschiede in gelb hervorgehoben sind.

Für die Durchführung der Experimente wurden die DNA-Fragmente, welche für das erste Elongations-Modul (*srfA-A1*), sowie die fünfte A-Domäne (*srfA-B2*) des Surfactin-Biosynthese-Genclusters kodieren, mittels PCR aus dem Chromosom von *B. subtilis* ATCC 21332 amplifiziert und in den *E. coli* Expressionsvektor pQE60 kloniert. Anschließend erfolgte die schrittweise Adaption der L-Glu bzw. L-Asp-selektiven Bindungstaschen der A-Domänen an den Aufbau der postulierten Erkennungsstellen für die verwandten Seitenkettenamide L-Gln bzw. L-Asn.

Bei der Konstruktion der Mutanten konnte in beiden Fällen gezeigt werden, dass der Austausch einer einzelnen Aminosäure in Position 239 (SrfA-A1 Lys239Gln) bzw. 322 (SrfA-B2 His322Glu) ausreichend war, um eine gezielte Veränderung der Substrat-Selektivität von der kognaten sauren Aminosäure zum korrespondierenden Seitenkettenamid herbeizuführen. Bei der Einführung dieser Mutationen kommt es zu einer Ladungsverschiebung innerhalb der aktiven Zentren. Im Falle von SrfA-A1 wurde eine basische (Lys) gegen eine polare (Gln) Aminosäure in der Substrat-Bindungstasche ausgetauscht, während im Falle von SrfA-B2 sogar eine Umkehrung der Ladung von basisch nach sauer erhalten wurde (His vs. Glu). Während die ursprünglich basischen Bindungstaschen offensichtlich die sauren Aminosäure-Substrate bevorzugen, zeigen die mutierten polaren bzw. aziden Bindungstaschen eine hohe Selektivität für die jeweiligen polaren Seitenkettenamide. Durch die eingeführten Mutationen in den Positionen 299 (Val vs. Ile) und 330 (Ile vs. Val) in der A-Domäne von SrfA-B2 blieb die Polarität der Substrat-Bindungstaschen dagegen unbeeinflusst. Für diese eingeführten Mutationen konnte auch keine signifikante Veränderung der Substrat-Selektivität beobachtet werden.

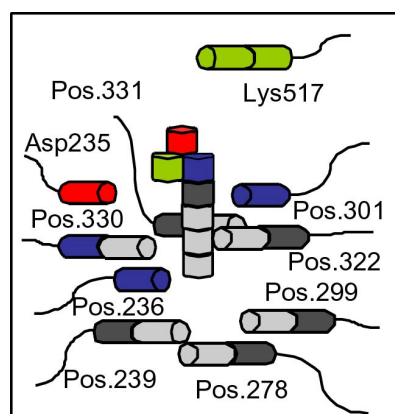


Abb. 8.2: Variationen der Bindungstaschen-aufbauenden Aminosäuren

Gezeigt ist die Variabilität der Aminosäuren an den zehn Positionen der Substrat-spezifischen Bindungstaschen von 160 untersuchten NRPSs A-Domänen. Diese Reste können in drei Gruppen unterteilt werden. Die beiden Reste Asp235 (azid: rot) und Lys517 (basisch: grün) sind annähernd invariant. Die drei Reste an den Positionen 236, 301 und 330 zeigen nur eine moderate Variabilität. In einer Vielzahl von A-Domänen (93 %) werden an diesen Positionen hydrophobe (blau) Aminosäuren verwendet. An den Positionen 239, 278, 299, 322 und 331 kann eine hohe Variabilität der verwendeten Aminosäuren beobachtet werden (grau).

All diese Ergebnisse bestätigen die frühere Annahme, dass die zehn Aminosäure-Reste, welche am Aufbau der Substrat-Bindungstasche beteiligt sind, einen unterschiedlichen Einfluss auf die Substrat-Selektivität der korrespondierenden A-Domäne ausüben (siehe Abb. 8.2) [Stachelhaus *et al.*, 1999].

Zwei Reste (Asp235 sowie Lys517) sind annähernd invariant und stabilisieren durch elektrostatische Interaktionen mit der α -Amino- sowie der α -Carboxylgruppe die Bindung der Substrat-Aminosäure. Drei weitere Reste (Position 236, 301 und 330) zeigen nur eine moderate Variabilität und üben somit wahrscheinlich nur einen modulierenden Einfluss auf die Substrat-Selektivität aus. Die drei hochvariablen Reste (Position 239, 322 und 331) hingegen scheinen für die Ausbildung der Substrat-Selektivität verantwortlich zu sein. Die beiden Reste an Position 278 und 299 zeigen ebenfalls eine hohe Variabilität, jedoch konnte hier gezeigt werden, dass diese Positionen auch innerhalb von A-Domänen der gleichen Selektivität stark variieren können, so dass ihnen eine flexible, Wobble-ähnliche Funktion zugesprochen wurde. Bei den Mutationen, welche im Falle von SrfA-A1 und SrfA-B2 zur Veränderung der Substrat-Selektivität führten, handelte es sich um die hochvariablen Positionen 239 und 322, welche maßgeblich an der Ausbildung der Substrat-Selektivität beteiligt sind. Im Falle der L-Asp aktivierenden A-Domäne von SrfA-B2 konnte gezeigt werden, dass die Einführung von weiteren Mutationen an den moderatvariablen Positionen 299 und 330 zu keiner Erhöhung der Substrat-Selektivität der korrespondierenden A-Domäne führt.

8.1.1 Auswirkungen der Substrat-Veränderung auf die katalytische Effizienz der konstruierten Mutanten

Bei der Konstruktion der Einzelmutante C-A_{Glu}-PCP (Lys239→Gln) konnte eine gezielte Veränderung der Substrat-Selektivität erhalten werden, ohne dass die katalytische Effizienz der A-Domäne beeinflusst wurde. In diesem Falle wurde sowohl für das Wildtyp-Protein als auch für die Mutante eine katalytische Effizienz von $k_{\text{cat}}/K_M = 9,4 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ erhalten. Beim analogen Experiment mit der A-Domäne von SrfA-B2 führte die Einführung der Punktmutation His322→Glu zwar zu der erwarteten Veränderung der Selektivität, jedoch war dies mit einer Reduktion der Aktivität des AspA-Derivates verbunden. Während das Wildtyp-Protein eine katalytische Effizienz von $k_{\text{cat}}/K_M = 2 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ aufweist, wurde eine um den Faktor zehn reduzierte Aktivität für die Einzelmutante AspA (His322→Glu) ermittelt ($k_{\text{cat}}/K_M = 0,22 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). Diese Reduktion der katalytischen Aktivität konnte auch

durch vollständige Adaptation der AspA-Bindungstasche an die Asparagin-selektive Bindungstasche der A-Domäne von BacC5 nicht kompensiert werden. Die korrespondierenden Doppel- und Triplemutanten AspA (His322→Glu, Val299→Ile), AspA (His322→Glu, Ile330→Val) und AspA (His322→Glu, Val299→Ile, Ile330→Val) wiesen jeweils die gleiche, um eine Größeneinheit erniedrigte katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_M = 0,22 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) auf.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass die Substrat-Selektivität von A-Domänen zwar - wie durch den nichtribosomalen Kode postuliert - von den Bindungstaschen-Konstituenten determiniert wird, ein Einfluss der proteinogenen Umgebung auf die katalytische Effizienz jedoch nicht ausgeschlossen werden kann. Um diese Möglichkeit eingehender zu untersuchen, wurden die Sequenzen der bislang bekannten Asp- und Asn- bzw. Glu- und Gln-selektiven A-Domänen miteinander verglichen (siehe Abb. 8.3 und Kapitel 9.2).

Die phylogenetische Verwandtschaft der untersuchten A-Domänen wurde mit Hilfe der Methode von Jotun Hein [Hein, 1990] ermittelt. Unter Berücksichtigung der vollständigen Primärstruktur zeigte sich hierbei, dass es zur Ausbildung von drei Zweigen an Aspartat- und Asparagin-selektiven A-Domänen kommt: einem gemischten, der aus den A-Domänen des Genus *Actinomyces* gebildet wird, sowie zweier getrennter Zweige der Aspartat- und Asparagin-selektiven A-Domänen des Genus *Bacillus*.

Im Gegensatz hierzu kann bei den Glutamat- und Glutamin-selektiven A-Domänen nur die Ausbildung zweier gemischter Cluster beobachtet werden. Die Gruppe Glu/Gln Fen wird aus den L-Glu-aktivierenden A-Domänen des Fengycin- und Plipastatin-Biosynthese-Genklusters aus *B. subtilis*, sowie der L-Gln aktivierenden Domäne des Anabaeno-Peptolid B (*Anabaena*) gebildet. Die zweite Gruppe Glu/Gln Srf baut sich aus den übrigen L-Glu- und L-Gln-aktivierenden A-Domänen aus *B. subtilis* und *B. licheniformis* auf. Da in beiden Klustern A-Domänen aus *B. subtilis* enthalten sind, stellt die Herkunft einer A-Domäne offensichtlich kein verlässliches Kriterium für die Einordnung in die ein oder andere Glu/Gln-Gruppe dar.

Zwischen den phylogenetisch deutlich getrennten Gruppen der L-Asp- und L-Asn-aktivierenden A-Domänen des Genus *Bacillus* konnte nur eine geringe Ähnlichkeit von ca. 40% determiniert werden, die vergleichbar ist mit der Gesamtähnlichkeit zwischen A-Domänen unterschiedlichster Selektivität (siehe Anhang). Im Gegensatz hierzu konnte jedoch innerhalb der Glu/Gln Srf-Gruppe eine hohe Ähnlichkeit von ca.

50 bis 60% zwischen den L-Glu- und L-Gln-aktivierenden A-Domänen determiniert werden. Betrachtet man nicht die gesamte A-Domäne, sondern nur die Region zwischen den Core-Motiven A4 und A5, welche die Bindungstasche der A-Domäne aufspannt, so verstärkt sich der Grad der Homologie sogar noch (siehe Kapitel 9.2).

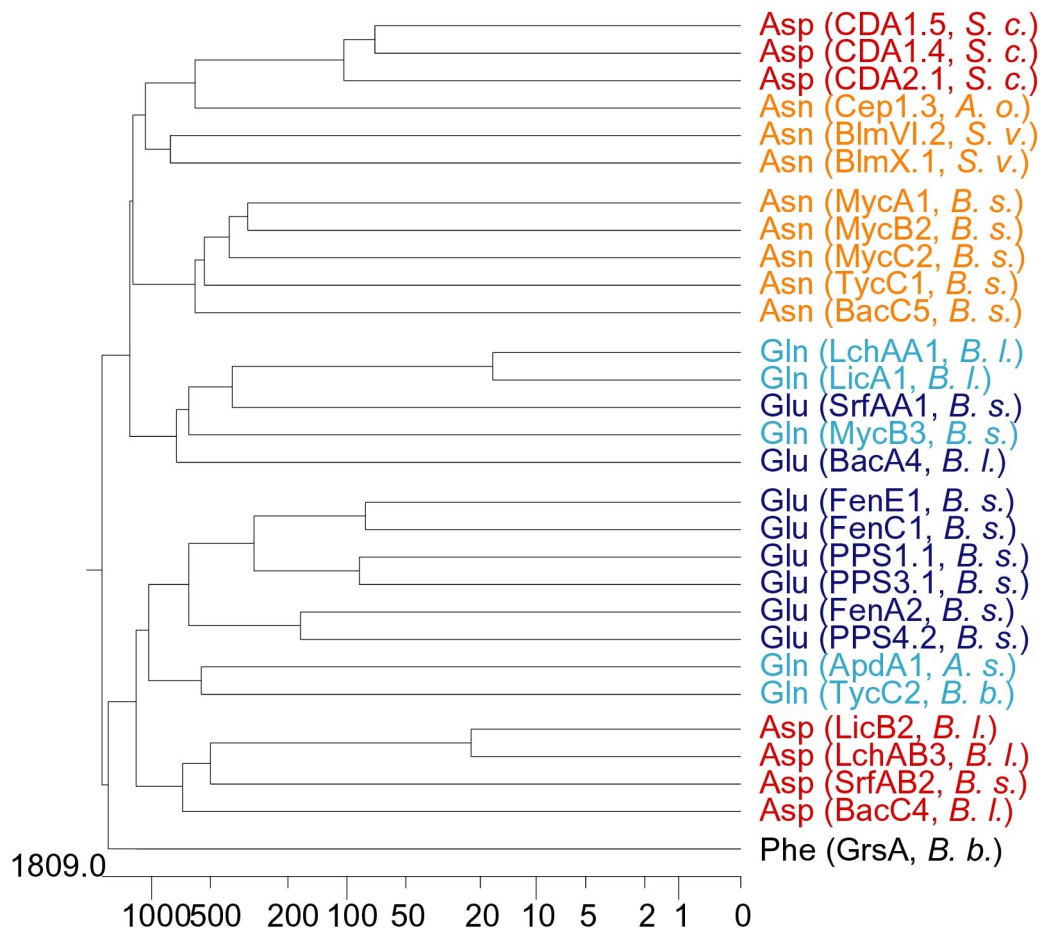


Abb. 8.3: Phylogenetische Verwandtschaft von Asp- und Asn-, sowie Glu- und Gln-selektiven A-Domänen

Für die Erstellung des phylogenetischen Baumes wurden die vollständigen Aminosäure-Sequenzen (ca. 550 Aminosäuren) von bekannten Asp/Asn- sowie Glu/Gln-selektiven A-Domänen miteinander verglichen (nach Jotun Hein). Als interner Standard diente die Sequenz der L-Phe-aktivierenden A-Domäne PheA. Während für die Asp- (rot) und Asn- (orange) selektiven A-Domänen je ein deutlich getrennter Cluster beobachtet wird, kommt es bei den Glu- und Gln-selektiven A-Domänen zur Ausbildung zweier gemischter Cluster (dunkel-/hellblau). Die Benennung dieser Gruppen Glu/Gln Fen und Glu/Gln Srf erfolgte anhand der Herkunft der Mehrzahl ihrer Vertreter.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass bei der gezielten Veränderung der Substrat-Selektivität die katalytische Effizienz tatsächlich in beträchtlichem Umfang von der Ähnlichkeit der A-Domänen abhängt. Bislang konnten die strukturellen Merkmale, die einen positiven Einfluss auf die katalytische Effizienz von A-Domänen ausüben, noch nicht determiniert werden. Aus diesem Grunde sollten Experimente zur Proteinevolution von A-Domänen idealerweise nicht auf die ca. 100

Aminosäure-Reste zwischen Core A4 und A5 beschränkt werden, sondern stattdessen alle ca. 550 Aminosäure-Reste einer A-Domäne berücksichtigen, welche die proteinogene Umgebung des aktiven Zentrums ausmachen.

8.1.2 Degenerierung des Selektivitäts-vermittelnden Kodes für Glutamat- sowie Glutamin-aktivierende A-Domänen

Wie in Abb. 8.3 gezeigt, kommt es im phylogenetischen Baum zur Ausbildung von zwei gemischten Gruppen von Glu/Gln-aktivierenden A-Domänen. Schaut man sich innerhalb dieser Gruppen die zehn Aminosäure-Reste genauer an (siehe Abb. 8.4 und 8.5), welche (putativ) die Substrat-Bindungstaschen dieser A-Domänen ausbilden, so fallen zwei interessante Punkte auf.

Positionen									
235	236	239	278	299	301	322	330	331	517
D	A	K	D	L	G	V	V	D	K
D	A	Q	D	L	G	V	V	D	K
D	L	W	H	F	G	G	V	D	K
D	L	W	Q	F	G	L	I	D	K

Glu Srf-Gruppe
Gln Srf-Gruppe

Glu Fen-Gruppe
Gln Fen-Gruppe

Abb. 8.4: Alignment der Glu/Gln-selektiven Bindungstaschen

Gezeigt ist das Alignment der zehn Aminosäure-Reste, die putativ die Bindungstaschen der L-Glu- und L-Gln-selektiven A-Domänen innerhalb der Gruppen Glu/Gln Fen und Glu/Gln Srf aufbauen. Übereinstimmungen von Aminosäure-Resten sind rot unterlegt, während Unterschiede in gelb hervorgehoben wurden.

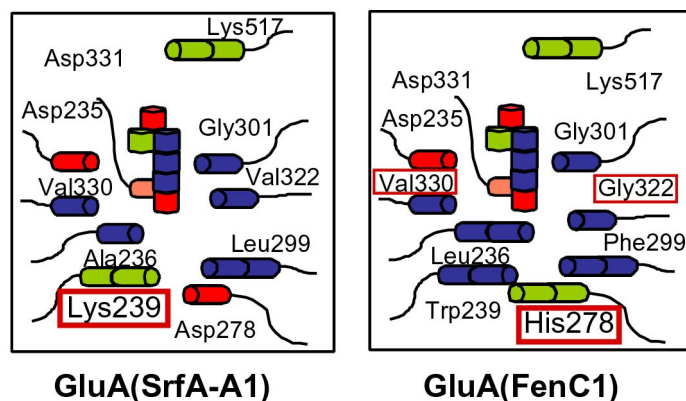


Abb. 8.5: Schematische Darstellung der putativen L-Glu-selektiven Bindungstaschen von SrfA-A1 und FenC1.

Die Modelle der Substrat-Bindungstaschen basieren auf der bekannten Kristallstruktur von PheA. Die an der Substrat-Erkennung beteiligten aliphatischen (blau), sauren (rot) und basischen (grün) Seitenketten sind schematisch dargestellt. Die entsprechenden Aminosäure-Reste für die gezielte Veränderung der Substrat-Selektivität von L-Glu zu L-Gln an den Positionen 239 bzw. 278, 322 und 330 sind in rot hervorgehoben.

Während sich die L-Glu- und L-Gln-selektiven Bindungstaschen innerhalb der Srf-Gruppe lediglich an einer einzigen Position unterscheiden, sind innerhalb der Fen-Gruppe drei variable Positionen zu beobachten (siehe Abb. 8.4 und 8.5).

Innerhalb der Fen-Gruppe kommt es nur zu moderaten Veränderungen der hydrophoben Aminosäure-Reste an den Positionen 322 (Gly vs. Leu) und 330 (Val vs. Ile), welche – auch vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit generierten AspA-

Mutanten - vermutlich keinen Effekt auf die Ausbildung der Substrat-Selektivität ausbilden. Im Gegensatz hierzu kommt es an der Position 278 zum Austausch der basischen Aminosäure His gegen die polare Aminosäure Gln, wodurch eine Ladungsverschiebung innerhalb der Bindungstasche induziert wird. Diese Position ist demnach vergleichbar zur hochvarianten, Selektivitäts-vermittelnden Position 239 innerhalb der Srf-Gruppe, wo analog der Austausch der basischen Aminosäure Lys gegen die polare Aminosäure Gln beobachtet wird.

Interessanterweise wurde jedoch ursprünglich postuliert, dass es sich bei den Positionen 278 und 299 um flexible, Wobble-ähnliche Reste handelt, die keinen oder nur geringen Einfluss auf die Substrat-Selektivität ausüben [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Das hier gezeigte Beispiel zeigt jedoch, dass anscheinend auch die Variation einer Wobble-Position ausreichend sein kann, um eine Veränderung der Substrat-Selektivität zu induzieren.

Des weiteren fällt beim Vergleich der L-Glu- und L-Gln-selektiven A-Domänen auf, dass die Mitglieder der Srf- und Fen-Gruppe deutlich unterschiedliche Strategien zur Erkennung ein und desselben Substrates entwickelt haben. Auch dieser Befund ist konsistent mit einer früheren Beobachtung, bei der eine Redundanz und Degenerierung des nichtribosomalen Kodes von NRPS A-Domänen beobachtet wurde [Stachelhaus *et al.*, 1999]. In den hier gezeigten Beispielen (siehe Abb. 8.4 und 8.5) werden insgesamt fünf Aminosäure-Substitutionen zwischen den Glu-Kodonen der Srf- und Fen-Gruppe beobachtet. Während es an den Positionen 236, 299 und 322 nur zu moderaten Veränderungen von hydrophoben Aminosäure-Resten kommt, kann die Verschiebung der Selektivitäts-vermittelnden basischen Aminosäure von der Position 239 (Lys; Srf-Gruppe) zur Wobble-Position 278 (His; Fen-Gruppe) beobachtet werden. Obwohl sich die beiden L-Glu-selektiven A-Domänen an fünf Positionen unterscheiden, wird offensichtlich nur ein modulierender Einfluss auf die Gestalt der Bindungstasche ausgeübt, die weiterhin in der Lage ist, das gleiche Aminosäure-Substrat zu aktivieren.

8.1.3 Erweiterung des Selektivitäts-vermittelnden Kodes

Die in dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten zur Veränderung der Substrat-Selektivität stützen sich im wesentlichen auf den nichtribosomalen Kode. Dieser wurde auf der Basis der Kristallstruktur der L-Phe-aktivierenden A-Domäne des Initiations-Moduls des Gramicidin S-Biosynthese-Genklusters aufgestellt. Kürzlich konnte nun durch die Aufklärung der Kristallstruktur der einzelständigen 2,3-

Dihydroxybenzoat (DHB)-aktivierenden A-Domäne Dh**b**E, die strukturelle Basis für die Erkennung und Aktivierung von Arylsäuren aufgeklärt werden [May *et al.*, 2002]. Beide Strukturen zeigen ein hohes Maß an Ähnlichkeit, offenbaren darüber hinaus aber auch zwei Hauptunterschiede zwischen Amino- und Arylsäure-aktivierenden A-Domänen im Bereich ihrer Substrat-Bindungstaschen.

So bildet das Core-Motiv A4 (FDxS) bei Aminosäure-aktivierenden A-Domänen den N-terminalen Ankerpunkt für die Bestimmung der Bindungstaschen-bildenden Aminosäure-Reste. Innerhalb dieses Cores liegt der invariante Rest Asp235, welcher durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der α -Aminogruppe zur Stabilisierung des gebundenen Substrates führt. Da die Arylsäuren keine α -Aminogruppe besitzen entfällt die Notwendigkeit von Asp235. Entsprechend ist dieser Rest in Arylsäure-aktivierenden Domänen wie Dh**b**E auch nicht konserviert. Anhand der Ko-Kristallisation von Dh**b**E mit den Substraten DHB und ATP konnte stattdessen gezeigt werden, dass der N-terminale Ankerpunkt für die Bestimmung der Bindungstaschen-Konstituenten hier durch das Sequenzmotiv "²³⁴HN**Y**PLSSPG²⁴²" (für PheA: "²³⁴FDASVWEMF²⁴²") determiniert wird (Nummerierung der Aminosäuren erfolgt anhand der Daten für PheA). Bei der Aktivierung von Arylsäuren ersetzt die polare Seitenkette von Asn die saure Seitengruppe von Asp an der invarianten Position 235. Hierdurch kommt es zur Stabilisierung des Substrates durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen Asn235 und der 2-Hydroxylgruppe des DHBs.

Der zweite strukturelle Unterschied betrifft das Core-Motiv A5, den C-terminalen Ankerpunkt bei der Bestimmung der Bindungstaschen-Konstituenten. Die Sequenz dieses Motivs unterscheidet sich stark zwischen Arylsäure-(³²⁰QVxGMA**E**GL³²⁹) und Aminosäure-aktivierenden A-Domänen (³²⁰NxYGPT**E**³²⁷). Dennoch ist der hochkonservierte Rest Glu327 (fett hervorgehoben) in den Strukturen von PheA und Dh**b**E an der gleichen räumlichen Position lokalisiert. Anschließend nehmen die Hauptketten der beiden A-Domänen jedoch kurzzeitig einen deutlich unterschiedlichen Verlauf. Dies ist in Abb. 8.6. anhand der Überlagerung beider Strukturen in der Region zwischen Position 327 bis 333 dargestellt.

Während bei Dh**b**E in dieser Region ein gerader Verlauf der Hauptkette zu beobachten ist, kommt es in der PheA-Struktur zur Ausbildung eines Bogens. Dieser Bogen hat zur Folge, dass in der Substrat-Bindungstasche von PheA die Seitenketten von Ile330 und Cys331 mit der Substrat-Aminosäure wechselwirken, während

die Seitenkette von Ala332 vom Substrat weg zeigt. Die Stabilisierung des DHBs erfolgt hingegen u.a. über die Seitenketten von Val330 und Tyr332, während hier die Seitenkette von Asn331 vom Substrat weg weist. Im Hinblick auf den Selektivitäts-vermittelnden Kode von NRPS A-Domänen wird also im Falle des DhbEs, dem Prototyp einer Arylsäure-aktivierenden A-Domäne, der hochvariable Aminosäure-Rest 331 durch den neuen, Bindungstaschen-aufbauenden Rest 332 ersetzt (siehe Abb. 8.6+7).

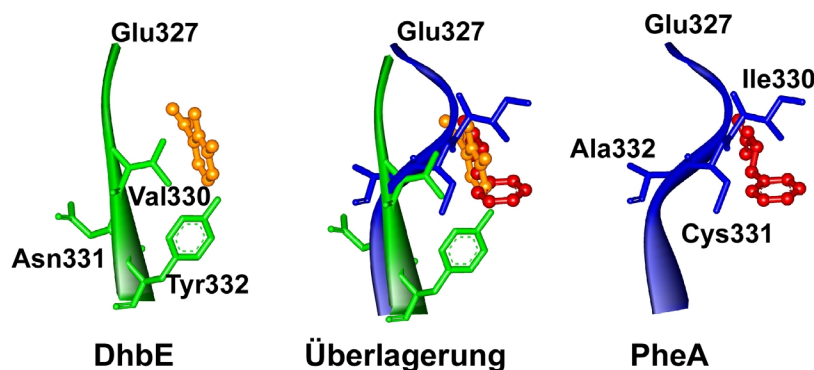


Abb. 8.6: Vergleich der Bindungstaschen von DhbE und PheA

Dargestellt ist der Verlauf der Hauptkette (durchgängiger Streifen) in der Region zwischen Position 327 und 333 der katalytischen Bindungstaschen von DhbE (grün) und PheA (blau). Die Substrate Phe (rot) und DHB (orange) sind im Kugel/Strich-Modell dargestellt, während die Aminosäure-Seitenketten an Position 330, 331 und 332 als Striche hervorgehoben sind. Während bei PheA die Reste Ile330 und Cys331 an der Substrat-Bindung beteiligt sind, wird DHB auf Grund des unterschiedlichen Hauptkettenverlaufes von Val330 und Tyr332 stabilisiert.

Da ein DhbE-ähnlicher Verlauf der Hauptkette nach Position 327 in den bisher strukturell nicht aufgeklärten A-Domänen nicht ausgeschlossen werden kann, müsste der Selektivitäts-vermittelnde Kode für NRPSs A-Domänen um die neue Position 332 erweitert werden (siehe Kapitel 9.3). Exemplarisch wurde dies in Abb. 8.7 für die verwendeten Glu-/Gln- bzw. Asp-/Asn-selektiven A-Domänen aufgezeigt. Im Falle der Glu/Gln-selektiven A-Domänen ist zu beobachten, dass sowohl die Position 331 als auch die Position 332 konserviert zu sein scheinen. Dementsprechend stellt der Rest Ala332 auch kein neues Ziel für eine gerichtete Mutagenese dar, da selbst im Falle eines veränderten, DhbE-ähnlichen Verlaufes der Hauptkette kein Unterschied zwischen Glu- und Gln-Kodonen zu beobachten wäre. Das Gegenteil gilt bei der gezielten Veränderung der Substrat-Selektivität einer Aspartat-aktivierenden A-Domäne (z. B. SrfA-B2) zum korrespondierenden Seitenkettenamid, in dem eine Veränderung des Aminosäure-Restes an Position 332 berücksichtigt werden müsste. Während an dieser Position in den Asp-selektiven A-Domänen der hydrophobe Rest Ala332 enthalten ist, tragen die Asn-selektiven A-Domänen hier die konservierte

polare Aminosäure Cys (siehe Anhang). Zur Überprüfung des Einflusses der neuen Position 332 auf die Selektivität und katalytische Effizienz von A-Domänen, müsste daher die neue Doppelmutante AspA (His322→Glu, Ala332→Cys) konstruiert und biochemisch charakterisiert werden.

Positionen										
235	236	239	278	299	301	322	330	331	332	517
D	A	W	T	I	A	A	I	C	A	K
N	Y	S	A	Q	G	V	V	N	Y	K
D	L	T	K	V	G	H	I	G	A	K
D	L	T	K	I	G	E	V	G	C	K
D	A	K	D	L	G	V	V	D	A	K
D	A	Q	D	L	G	V	V	D	A	K
Phe (GrsA)										
DHB (DhbE)										
Asp (SrfA-B2)										
Asn (BacC5)										
Glu (SrfA-A1)										
Gln (LicA1)										

Abb. 8.7: Erweiterung des Selektivitäts-vermittelnden Codes

Gezeigt ist der erweiterte, elf Aminosäure-umfassende Code für NRPS A-Domänen. Die zusätzliche Position 332 ist in rot hervorgehoben. In PheA und DhbE sind die Positionen, die aufgrund der strukturellen Daten keinen direkten Einfluss auf die Substrat-Bindung ausüben in grau unterlegt. In dem Alignment der korrespondierenden elf Bindungstaschen-aufbauenden Aminosäuren der L-Glu/L-Gln-selektiven bzw. L-Asp/L-Asn-selektiven A-Domänen sind die Aminosäuren bei Übereinstimmungen in rot unterlegt, während die Unterschiede in gelb hervorgehoben sind.

8.2 Veränderung der Substrat-Selektivität von NRPS A-Domänen *in vivo*

Im zweiten Teilexperiment sollte untersucht werden, ob sich die ortsgerichtete Mutagenese der Bindungstaschen-aufbauenden Aminosäuren für das Design neuer Peptidantibiotika eignet. Als Modelsystem hierfür diente das Surfactin-Biosynthese-Operon von *B. subtilis* (siehe Abb. 8.8) [Cosmina *et al.*, 1993].

In einer Vielzahl von *Bacillus* Stämmen konnte bislang die Produktion unterschiedlicher Lipoheptapeptid-Derivate nachgewiesen werden. Diese Produkte lassen sich in die zwei Familien der Surfactine und Lichensysine unterteilen. Während in den Surfactinen als Startaminosäure Glutamat enthalten ist, beginnen die Lichensysine mit dem korrespondierenden Seitenkettenamid Glutamin. Weiterhin können innerhalb der Familien Variationen der hydrophoben L-Aminosäuren an Position 4 und 7 beobachtet werden [Peypoux *et al.*, 1999; Yakimov *et al.*, 2000], während die Positionen 2, 3, 5 und 6 keine Veränderungen aufweisen.

Aufgrund seiner Oberflächenspannung-reduzierenden Aktivität stellt Surfactin ein interessantes Biomolekül für die Industrie dar. Zur Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehung wurde im letzten Jahrzehnt versucht, eine Vielzahl neuer

Derivate auf biosynthetischem Wege zu erzeugen. So war es möglich durch Zufütterung von ausgesuchten Aminosäuren neue Derivate zu erhalten, welche Variationen der L-Aminosäuren an Position 2, 4 und/oder 7 aufwiesen [Peypoux *et al.*, 1999]. Bei all diesen Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass die D-Aminosäuren an Position 3 und 6, sowie der L-Aspartat-Rest an Position 5 hochkonserviert und invariant zu sein scheinen.

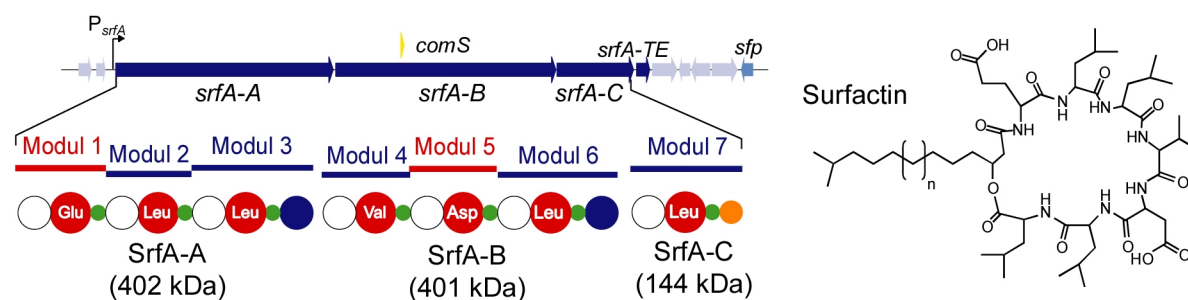


Abb. 8.8: Das Surfactin-Biosynthese-Operon aus *B. subtilis* ATCC 21332

Gezeigt ist die chromosomale Region des Surfactin-Biosynthese-Genclusters (*srfA*) von *B. subtilis* ATCC 21332 mit den Genen *srfA-ABCTE*. Die drei Peptidsynthetasen SrfA-ABC katalysieren die Bildung des Lipopeptides Surfactin ($n=1-3$). Die für die Selektivitäts-Veränderung verwendeten Module 1 und 5 sind in rot hervorgehoben.

So beschränkten sich die ersten Versuche zum rationalen Design neuer Lipopeptid-Derivate folglich auf die variablen Positionen 1, 2 und 7. Die meisten Aminosäure-Substitutionen wurden hierbei an Position 7 durchgeführt, wo anhand des Austausches von Minimal-Modulen (A-PCP) innerhalb des Elongations-Moduls 7 die neuen Reste L-Phe, L-Cys und L-Orn inkorporiert werden konnten [Stachelhaus *et al.*, 1995]. Analog gelang es, die nicht-proteinogene Aminosäure L-Orn an Position 2 zu integrieren [Schneider *et al.*, 1998]. Mit Hilfe dieser Minimal-Modul-Austausche war es zwar möglich die neuen Surfactin-Derivate zu produzieren, jedoch musste eine starke Verringerung der Produktivität beobachtet werden. Das dieser Verlust der Produktivität nicht ausschließlich auf die Akzeptor-Selektivität der C-Domäne zurückgeführt werden kann, konnte anhand des Austausches des vollständigen Elongations-Moduls 2 mit der Domänenorganisation C-A-PCP aufgezeigt werden [Mootz *et al.*, 2002b]. Vielmehr ist davon auszugehen, dass es beim Austausch zu Störungen der inter- und intramodularen Kommunikation, sowie der Tertiärstruktur kommt. Diese Probleme konnten beim Austausch des vollständigen Elongations-Moduls 1 SrfA-A1 gegen das homologe Glutamin-selektive Elongations-Modul 1 des Lichenysin-Biosynthese-Operons (LicA1) vermieden werden. In diesem Falle kommt es zum Austausch von Proteinfragmenten hoher Homologie (60% Ähnlichkeit), so

dass die genannten Störungen weitgehend minimiert und kein Verlust der Produktivität bei der Biosynthese des neuen [Glu¹]-Surfactin-Derivat beobachtet werden konnte [Yakimov *et al.*, 2000].

8.2.1 Veränderung der Substrat-Selektivität an Position 5 des Surfactin-Biosynthese-Systems

In der vorliegenden Arbeit sollte die Anwendbarkeit des nichtribosomalen Kodes als neue Methode für die gerichtete Manipulation des Surfactin-Biosynthese-Operons untersucht werden. Im ersten Experiment wurde hierbei die hochkonservierte Aminosäure L-Asp an Position 5 des Lipoheptapeptides ausgetauscht. Wie zuvor erläutert, galt diese Position als invariant und so konnten in früheren Studien auch keine neuen Lipoheptapeptide durch den Austausch von Minimalmodulen innerhalb des Elongations-Moduls 5 des NRP-Biosynthese-Templates generiert werden [Schneider, 1996]. Deshalb sollte nun untersucht werden, ob durch die Einführung einer einzigen Punktmutation His322→Glu, welche zur Veränderung der Substrat-Selektivität der A-Domäne des fünften Moduls von L-Asp zu L-Asn führt, die Produktion des neuen [Asn⁵]-Surfactin-Derivates ermöglicht wird. Für die genetische Manipulation des Surfactin-Biosynthese-Genclusters wurde eine zweistufige Marker-Austausch-Methode verwendet. Hierbei wurde zuerst die kodierende Region *srfA-B2* mit der selektierbaren Chloramphenicol-Resistenz-Kassette *cat* unterbrochen, bevor die Rekonstitution durch Integration des mutierten DNA-Fragmentes *srfA-B2*(H322E) erfolgte. Nach der Konstruktion der Mutante *B. subtilis* KE100 wurden die produzierten Lipopeptide mittels HPLC/MS und MS/MS analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das erwartete neue Lipopeptid-Derivat [Asn⁵]-Surfactin produziert wird. Somit war der Austausch eines einzelnen Aminosäure-Restes in der 401 kDa umfassenden Peptidsynthetase SrfA-B ausreichend, um eine Variation der Aminosäure an der hochkonservierten Position 5 des Lipoheptapeptides zu generieren.

In den Extrakten des Kulturüberstandes von *B. subtilis* KE100 konnte neben dem neuen [Asn⁵]-Derivat auch Wildtyp-Surfactin ([Asp⁵]-Surfactin) detektiert werden. Da das [Asn⁵]-zu-[Asp⁵]-Verhältnis über die Zeit abnahm, d.h. über die Zeit mehr Wildtyp-Surfactin gebildet wurde, konnte ein eventueller Einfluss von Nebenspezifitäten der NRPS A- und C-Domänen ausgeschlossen werden. Im Falle einer Enzym-katalysierten Bildung des Wildtyp-Derivates wäre nämlich ein konstantes [Asn⁵]- zu [Asp⁵]-Verhältnis zu erwarten gewesen. Aufgrund der vorliegenden Daten

ist daher eine Instabilität des [Asn⁵]-Derivates die naheliegendste Erklärung. Für eine Vielzahl von Peptiden und Proteinen wurde die Desamidierung von Asparagin-Resten berichtet [Bischoff & Kolbe, 1994], die im Falle des [Asn⁵]-Surfactins zum Abbau des Asparagin-Restes an Position 5 und zur Bildung von Wildtyp-[Asp⁵]-Surfactins führen würde. Eine solche Desamidierung stände im Einklang mit der beobachteten zeitlichen Abnahme des [Asn⁵]- zu [Asp⁵]-Verhältnisses

8.2.2 Veränderung der Substrat-Selektivität an Position 1 des Surfactin-Biosynthese-Systems

Am Beispiel des Surfactin-Biosynthese-Systems aus *B. subtilis* OKB105 konnte bereits die erfolgreiche L-Glu- zu L-Gln-Substitution an Position 1 des Lipoheptapeptids aufgezeigt werden. Hierbei war es Yakimov *et al.* [Yakimov *et al.*, 2000] möglich, nach dem Austausch des vollständigen Elongations-Modul 1 gegen das homologe Modul des Lichenysin-Biosynthese-Systems aus *B. licheniformis*, das veränderte [Gln¹]-Surfactin aus *B. subtilis* 1D1 zu isolieren und zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits *in vitro* gezeigt, dass die Einführung der Punktmutation Lys239Gln in die A-Domäne von SrfA-A1 ausreichend ist, um eine Umwandlung der Substrat-Selektivität von L-Glu nach L-Gln zu erreichen. Dies sollte nachfolgend auf das *in vivo*-System übertragen werden, um - in Analogie zum gerade gezeigten [Asn⁵]-Surfactin - das entsprechende [Gln¹]-Acylheptapeptid zu produzieren. Im Vergleich zum Yakimov-Experiment, in dem ein gesamtes Elongations-Modul bestehend aus 1045 Aminosäure-Resten ausgetauscht wurden, würde sich hierbei der Eingriff in das Proteintemplat auf die Veränderung einer einzigen Aminosäure minimieren.

Wiederum wurde für die genetische Manipulation des Surfactin-Biosynthese-Genklusters die zweistufige Marker-Austausch-Methode verwendet. Jedoch war es - aus bislang ungeklärten Gründen - nach der Unterbrechung des *srfA-A*-Gens diesmal nicht möglich, dieses Gen durch die Integration des mutierten DNA-Fragmentes *srfA-A1*(L239Q) in *B. subtilis* KE150 zu rekonstituieren. Ein methodischer Fehler konnte ausgeschlossen werden, da eine erfolgreiche Integration unter Verwendung des Wildtyp-Fragmentes erhalten wurde (siehe Konstruktion von *B. subtilis* KE160, Kapitel 5.4.3, diese Arbeit).

8.2.3 Sensitivität von *B. subtilis* ATCC 21332

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *B. subtilis* ATCC 21332 stellt kein isogenes Derivat von *B. subtilis* OKB105 dar, wodurch eine erhöhte Sensitivität von *B. subtilis* ATCC 21332 gegen das neue Surfactin-Derivat eine mögliche Erklärung für das Misslingen der Integration des mutierten DNA-Bereiches *srfA-A1*(L239Q) in das Surfactin-Biosynthese-Genkluster darstellen könnte. Für das in *B. subtilis* 1D1 produzierte [Gln¹]-Surfactin-Derivat konnte eine erhöhte Oberflächen-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Surfactin nachgewiesen werden [Yakimov, et al., 2000]. [Gln¹]-Surfactin ist in der Lage die Oberflächenspannung von Wasser von 72 mN/m auf 25,5 mN/m zu reduzieren, wobei die kritische micellare Konzentration (*critical micelle concentration* CMC) bereits bei 13,5 µM erreicht wird. Die Oberflächenaktivität ist damit vergleichbar mit der des Lichenysin A (12 µM) und liegt aber deutlich über der des Surfactins (CMC = 20 µM). Diese Variation der Aktivität lässt sich auf die Herabsetzung der Polarität des Peptidteils beim Austausch von L-Glu zu L-Gln zurückführen. Hierdurch kommt es zu einer Veränderung des Hydrophilie-Lipophilie-Verhältnisses, welches offensichtlich einen positiven Einfluss auf die Oberflächen-Aktivität ausübt. Während die Aktivität des Surfactins darüber hinaus durch hohe Natriumchlorid-Konzentrationen inhibiert wird, konnte eine Halotoleranz für das [Gln¹]-Lipoheptapeptid determiniert werden.

Eine wichtige Voraussetzung für das rationale Design von neuen Peptid-antibiotika ist die Autoimmunität des Produzentenstammes gegen das gebildete Produkt. Kürzlich konnte in *B. subtilis* der Selbst-Resistenz-Mechanismus gegen das Lipoheptapeptid Surfactin aufgeklärt werden [Tsuge et al., 2001]. Das kodierte Protein des identifizierten Gens *yerP* stellt das erste Mitglied der Familie der Protonen-angetriebenen Efflux-Pumpen der Resistenz, Nodulation und Zellteilung (RDN) in Gram-positiven Bakterien dar. Die Deletion von *yerP* führte zum Erhalt von Surfactin-sensitiven Mutanten. Obwohl der Transport noch nicht direkt gezeigt werden konnte, geht man davon aus, dass der Export des gebildeten Surfactins von YerP katalysiert wird. Eingehende Untersuchungen zur Selektivität dieser Efflux-Pumpe sind von großem Interesse, um auftretende Probleme wie z. B. toxische Nebenwirkungen der Surfactin-Derivate ausschließen zu können. Je breiter die Substrat-Selektivität von YerP ist, um so größer wären die Möglichkeiten für die genetische Manipulation des Surfactin-Biosynthese-Genklusters zum rationalen Design von neuen Lipopeptiden.

8.2.4 Selektion auf den Verlust eines Marker-Gens in *B. subtilis*

Eine Limitierung der Anwendbarkeit der genetischen Manipulation von NRPS-Biosynthese-Genklustern, und damit eventuelle Mit-Ursache des Scheiterns der Veränderung der Substrat-Selektivität an Position 1 des Surfactin-Biosynthese-Systems, könnte die Verwendung der zweistufigen Marker-Austausch-Methode sein. Hierbei wird das interessierende NRPS-Gen zunächst mit einem selektierbaren Marker unterbrochen und anschließend mit einem mutierten Gen-Fragment rekonstituiert. Da es bei zweiten Schritt nicht möglich ist, positiv auf die Integration des mutierten Bereiches und den Verlust des Markers zu selektieren, erfolgt diese Rekonstitution üblicherweise mittels eines Kongression-Experimentes. Hierbei wird auf den Erhalt eines unabhängigen Markers selektiert, in der Hoffnung, dass eine simultane Rekonstitution des interessierenden NRPS-Gens stattgefunden hat (siehe Abb. 8.9).

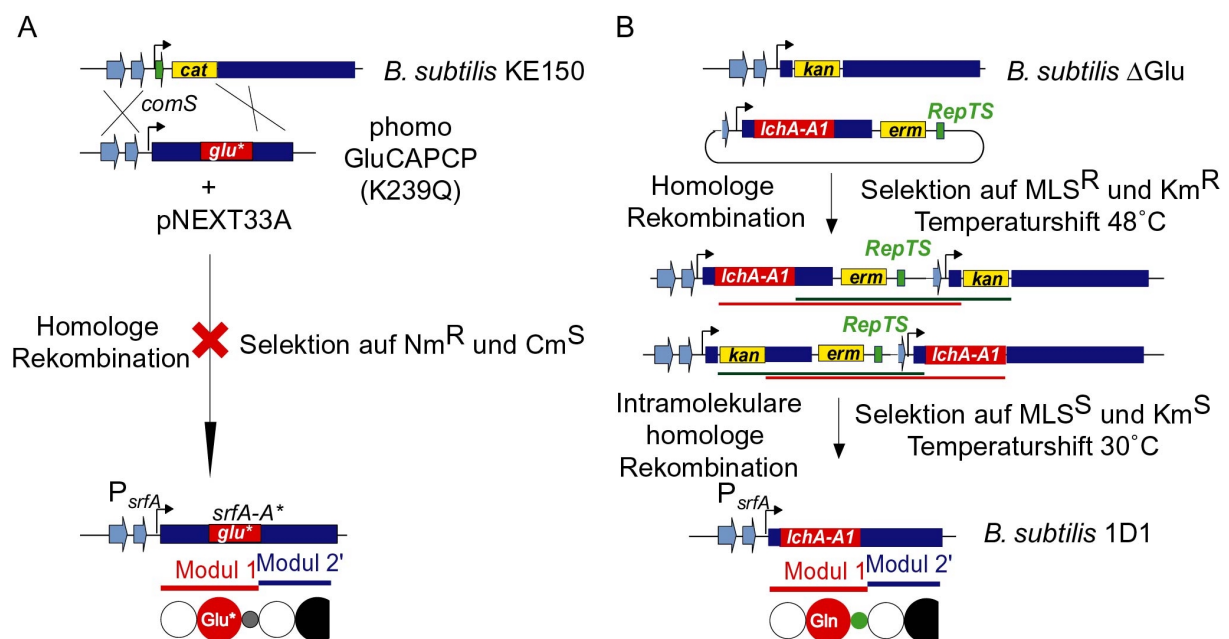


Abb. 8.9: Genetische Manipulation der Position 1 des Surfactin-Biosynthese-Genklusters

A) Schematische Darstellung des durchgeführten Kongression-Experimentes. *B. subtilis* KE150 wurde parallel mit dem Integrationsplasmid phomoGluCAPCP(K239Q) und dem Helferplasmid pNEXT33A transformiert (Kongression). Leider konnte hierbei keine erfolgreiche Rekonstitution von *srfA-A* und Integration der mutierten Region *gluCAPCP*(K239Q) erreicht werden. In B) ist schematisch der Modul-Austausch von Yakimov *et al.* gezeigt. Bei einer Temperatur von 48 °C liegt RepTS in der inaktiven Form vor, so dass eine Single-Crossover-Integration ermöglicht wird. Beim folgenden Temperaturshift auf 30 °C wird unter dem Druck des aktiven Replikons das Ausloopen erzwungen. Die ausloopenenden DNA-Bereiche sind unterstrichen dargestellt. Grün: Bildung der Rekonstitution von *srfA-A1*; rot: Rückbildung der Deletionsmutante.

Bei der beschriebenen Konstruktion von *B. subtilis* 1D1 hingegen erfolgte die Integration unter dem Druck des Temperatur-sensitiven Replikons *RepTS* [Yakimov *et al.*, 2000] (siehe Abb. 8.9). Der erste Transformationsschritt erfolgt bei 48°C. Bei dieser Temperatur liegt das Replikon in der inaktiven Form vor, so dass die Integration des vollständigen Plasmids über Single-Crossover erfolgen kann. Auf dieses Ereignis kann aufgrund der vorhandenen Resistenz-Gene gegen MLS und Km positiv selektiert werden. Im zweiten Schritt erfolgt ein Temperaturshift auf 30°C, wobei das Replikon aktiviert wird. Da innerhalb eines zusammenhängenden DNA-Fragmentes jedoch nur ein Replikon existieren darf, können nun nur jene Zellen überleben, die *RepTS* ausloopen. Die erhaltenen MLS-sensitiven Klone, in denen das Plasmid ausgeloopt wurde, mussten anschließend auf Km-Sensitivität untersucht werden, da es neben der stabilen Integration des fremden DNA-Bereiches auch zur Rückbildung der Km-resistenten Deletionsmutante *B. subtilis* Δ Glu kommen könnte (siehe Abb. 8.9). In der Tat beobachteten Yakimov *et al.*, dass nur etwa 10% ihrer erhaltenen, MLS-sensitiven Transformanten auch den Verlust des selektierbaren *kan*-Markers und die Integration von *lchA-A1* aufwiesen.

Eine Vereinfachung der genetischen Manipulation des Surfactin-Biosynthese-Genklusters könnte durch die Verwendung einer Gegenselektions-Methode erreicht werden. Hierbei würde bei der Unterbrechung des NRPS-Gens neben dem selektierbaren Marker (Resistenz-Kassette) ein weiteres Gen integriert werden, auf dessen Verlust anschließend positiv selektiert werden kann.

Ein solches Gegenselektions-System wurde kürzlich für *B. subtilis* beschrieben und basiert auf der Verwendung des *upp*-Gens, welches für die Uracil-Phosphoribosyl-Transferase (UPRTase) kodiert [Fabret *et al.*, 2001]. Dieses Enzym ist in den Pyrimidin-Stoffwechsel involviert und katalysiert die Bildung von UMP aus Uracil und 5'-Phosphoribosyl- α -1-Pyrophosphat. Bei dem beschriebenen System macht man sich die Nebenspezifität der UPRTase für 5-Fluorouracil zu Nutzen. Bei der Enzym-katalysierten Reaktion kommt es hierbei zur Bildung des toxischen 5-Fluoro-UMP, welches zum Absterben der *upp*-exprimierenden Bakterien-Zellen führt.

Um die Verwendung dieses Selektionssystem in *B. subtilis* ATCC 21332 zu ermöglichen, wurde in einem ersten Schritt von Frau Nadine Kessler das inhärente *upp*-Gen deletiert. Anschließend soll dieser *upp*-Deletionsstamm *B. subtilis* NK20 für die Integration einer selektierbaren Resistenz-Kassette sowie einer neuen Kopie von

upp in die *srfA-A1* Region verwendet werden. Bei der folgenden Transformation des erhaltenen *B. subtilis* Stammes mit dem mutierten DNA-Fragment *srfA-A1*(L239Q), könnte anschließend direkt auf die Rekonstitution von SrfA-A1 selektiert werden. Nur jene Transformanten, welche einen Verlust von *upp* und somit die Rekonstitution von SrfA-A aufweisen, wären in der Lage auf 5-Fluorouracil-haltigen Medium zu wachsen. Alle anderen Zellen würden dagegen aufgrund der UPRTase-katalysierten Bildung des toxischen 5-Fluoro-UMPs absterben.

8.3 Veränderung der Substrat-Selektivität - ein Ausblick

Am Beispiel der Produktion des neuen [Asn⁵]-Surfactin-Derivates in *B. subtilis* KE100 konnte die Anwendbarkeit des Selektivitäts-vermittelnden Kodes für das rationale Design von neuen Peptidantibiotika aufgezeigt werden. Jedoch müssen bei der Anwendung dieser Technologie einige Limitierungen berücksichtigt werden. Zum einen macht die Veränderung der Substrat-Selektivität von NRPSs A-Domänen nur in dem Umfang Sinn, in dem das alternative Substrat von benachbarten Domänen und Modulen prozessiert werden kann (Stichwort: Akzeptor-Selektivität von NRPS C-Domänen). Zum anderen sind die bislang beschriebenen Beispiele für die Veränderung der Substrat-Selektivität auf die Einführung von maximal drei Punktmutationen in die Substrat-Bindungstasche limitiert. Folglich konnten bisher nur leichte Variationen in der Gestalt bzw. Polarität des erkannten Substrates erzielt werden (L-Phe vs. L-Leu, L-Asp vs. L-Asn und L-Glu vs. L-Gln). Ungeachtet dessen belegen die experimentellen Daten jedoch eindeutig den unterschiedlichen Einfluss der Bindungstaschen-aufbauenden Aminosäuren auf die Selektivität der A-Domänen. Diese Information ermöglicht nun die gezielte Modellierung der Substrat-Selektivität von A-Domänen, wodurch beispielsweise vollständig neue Substrate für eine Aktivierung durch NRPSs A-Domänen zugänglich gemacht werden könnten.

Allgemein handelt es sich bei NRPSs um Enzyme mit breiter Substrat-Spezifität. Dies führt bei der Fermentation der entsprechenden Produzentenstämme zur Bildung verschiedener Derivate eines NRPs, von denen in der Regel nur eine Verbindung die gewünschte biologische Aktivität besitzt. Prominente Beispiele hierfür sind der Antitumor-Wirkstoff Epothilon, das immunsuppressive Cyclosporin, sowie das Peptidantibiotikum Bacitracin. So kommt es z. B. bei der Fermentation von *B. licheniformis* zur Produktion eines heterogenen Komplexes aus 15 verschiedenen, zyklisch-verzweigten Dodecapeptiden, von denen nur für das Hauptprodukt,

Bacitracin A, eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden konnte. In diesem Zusammenhang stellt die Modulation der Substrat-Selektivität von A-Domänen eine nützliche Methode dar, um die Nebenspezifitäten der NRPSs zu reduzieren. Hierdurch könnte die Produktion der Nebenprodukte unterdrückt werden und eine erhöhte Effizienz der fermentativen Peptidantibiotika-Produktion erzielt werden.

8.4 Heterologe Expression von NRPS-Genen in *B. subtilis*

In der vorliegenden Arbeit konnte die vorteilhafte Verwendung des *srfA*-Deletionsstammes *B. subtilis* KE30 für die heterologe Expression von NRPS-Genen aufgezeigt werden. Zunächst wurde anhand der Konstruktion des bi-funktionalen Vektorsystems die Expression eines artifiziellen dimodularen NRPS-Systems parallel in *E. coli* und *B. subtilis* getestet. Während im heterologen Wirt *E. coli* eine Degradation des rekombinanten Proteins beobachtet wurde, konnte in *B. subtilis* lösliches, funktionelles und posttranslational-modifiziertes Protein erhalten werden.

Als weiteres Beispiel für die heterologe Expression von NRPS-Genen in *B. subtilis* KE30 diente die Rekonstitution des vollständigen, 49kb-umfassenden Bacitracin-Biosynthese-Genklusters aus *B. licheniformis* ATCC 10716 [Konz *et al.*, 1997]. Hierbei konnte wiederum gezeigt werden, dass der heterologe Wirt *B. subtilis* in der Lage ist, die drei nichtribosomalen Peptidsynthetasen BacABC in einer funktionellen und posttranslational-modifizierten holo-Form zu produzieren. Aufgrund der zusätzlichen Expression der mit der Bacitracin-Synthese assoziierten Gene *bacT*, *bacRS* und *bcrABC* ist der generierte *B. subtilis* Stamm darüber hinaus in der Lage eine Selbst-Resistenz gegen Bacitracin auszubilden und signifikante Mengen des verzweigt-zyklischen Peptidantibiotikums zu produzieren.

8.4.1 Chromosomale Integration in die ehemalige *srfA*-Region von *B. subtilis* KE30

Die gut untersuchten genetischen und fermentativen Methoden, sowie die Fähigkeit eine Vielzahl von nichtribosomalen Peptiden zu produzieren, machen *B. subtilis* zu einem attraktiven Wirt für die heterologe Expression von NRPS-Genen. Ein Problem hierbei stellt jedoch die beschriebene Instabilität von Plasmiden dar, welche eine Integration der rekombinanten Gene in das *Bacillus*-Chromosom erforderlich macht [Bron *et al.*, 1991; Ehrlich *et al.*, 1986]. Obwohl eine solche Integration zeitaufwendig ist, so liefert sie doch in der Regel stabile Chromosomen, so dass während der Fermentation kein Verlust der genetischen Information beobachtet

werden kann. Dies stellt einen bedeutenden Vorteil gegenüber vergleichbaren Ansätzen in *E. coli* dar, in denen beispielsweise versucht wurde, den vollständigen Polyketid-Biosynthese-Gencluster für 6-Deoxyerythronolid B aus *Saccharopolyspora erythraea* auf einem trimeren Vektorsystem in *E. coli* zu rekonstituieren [Pfeifer *et al.*, 2001]. Aufgrund der Inkompatibilität und Instabilität der Plasmide kam es hierbei während der Fermentation zum Verlust eines Teils der rekombinanten, genetischen Information und in der Folge zur Verringerung der Produktivität des artifiziellen Systems.

Im Gegensatz hierzu konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit durchgeführte Integration des Bacitracin-Biosynthese-Genclusters in *B. subtilis* auch über mehrere Generationen stabil ist. Ein kritischer Punkt bei der Einführung des vollständigen, 49kb-umfassenden Biosynthese-Genclusters war jedoch die damit einhergehende Vergrößerung des *B. subtilis* Chromosoms um 1,1%. Um hierdurch eventuell auftretende Probleme auszuschließen, wurde der eigens hierfür konstruierte *B. subtilis* Stamm KE30 verwendet, in welchem das 26kb-umfassende *srfA*-Biosynthese-Operon deletiert wurde. Auf diese Weise konnte die Expansion des Chromosoms auf 0,5% reduziert, sowie eine unerwünschte Wechselwirkung zwischen dem *B. subtilis* inhärenten Surfactin-Biosynthese-Operon und dem rekombinanten NRPS-System ausgeschlossen werden.

8.4.2 Überproduktion von NRPSs in *B. subtilis*

Aufgrund ihrer enormen Größe und ihres multimodularen Aufbaus stellt die heterologe Produktion von NRPSs einen Engpass für die biochemische Charakterisierung dieser Enzyme dar. Bislang beschränkten sich die Untersuchungen zur heterologen Expression von NRPS-Genen auf den Wirt *E. coli*. Hierbei musste jedoch in vielen Fällen die Bildung von unlöslichen, inaktiven oder degradierten Proteinen beobachtet werden [Pfeifer & Khosla, 2001; Symmank *et al.*, 1999]. Diese Problematik lässt sich wahrscheinlich auf eine unzureichende Faltung der heterolog überproduzierten Enzyme zurückführen. Eine Lösung dieses Problems konnte anhand der heterologen Expression von NRPS-Genen aus filamentösen Pilzen und Actinomyceten aufgezeigt werden. Unter der Verwendung eines verwandten Wirtes war es hierbei möglich, die Proteine in einer funktionellen, aktiven Form zu produzieren [Schauwecker *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1990b].

Da eine Vielzahl der bislang bekannten nichtribosomalen Peptidantibiotika in Mikroorganismen des Genus *Bacillus* produziert werden [Stachelhaus *et al.*, 2002], sollte

in dieser Arbeit u. a. ein alternatives Expressionssystem für NRPS-Gene im verwandten, heterologen Wirt *B. subtilis* etabliert werden. Dieser Organismus ist in der Lage, die inhärenten Synthetasen des Bacillibactin-, Fengycin-, Iturin-, Plipastatin-, Surfactin- und Mycosubtilin-Biosynthese-Systems in einer stabilen, löslichen und aktiven Form zu produzieren [Duitman *et al.*, 1999; Feignier *et al.*, 1996; Galli *et al.*, 1994; May *et al.*, 2000; Steller & Vater, 2000; Tsuge *et al.*, 1999]. Des weiteren könnte aufgrund des unterschiedlichen Kodon-Gebrauches die Verwendung eines Gram-positiven Wirtes für die heterologe Produktion von NRPSs - besonders von solchen aus genetisch unzugänglichen *Bacillus* Stämmen, wie z. B. des Bacitracin-Biosynthese-Systems aus *B. licheniformis* - von Vorteil sein.

Am Beispiel der Produktion des artifiziellen, dimodularen Systems $C_{srfA-A1^-}$ (A_{Asp} -PCP-C- A_{Leu} -PCP) $_{srfA-B2-3}$ (218 kDa), sowie der drei Bacitracin Synthetasen BacA (598 kDa), BacB (297 kDa) und BacC (723 kDa) konnten die Vorteile des heterologen Wirtes *B. subtilis* aufgezeigt werden. In beiden Fällen konnten in *B. subtilis* (im Gegensatz zu *E. coli*) vollständige, stabile und lösliche Proteine erhalten werden. Weitergehende biochemische Untersuchungen zeigten weiterhin, dass *B. subtilis* in der Lage ist, die riesigen, multimodularen NRPSs in ihrer aktiven, posttranslational-modifizierten holo-Form zu produzieren.

Die heterologe Produktion funktioneller Multienzyme in *B. subtilis* konnte in dieser Arbeit durch die Anwendung zweier unterschiedlich regulierter Promotoren erreicht werden.

Im konstruierten bi-funktionalen Vektorsystem stehen die klonierten (NRPS) Gene unter der Kontrolle eines optimierten Promotor-Operator-Elements, welches aus einer Fusion des T5-Phagenpromotors P_{N25} mit zwei modifizierten *lac*-Operator-Sequenzen besteht (aus *pQE60*, Qiagen, Hilden, Germany). Der verwendete T5-Promotor ist sowohl in *E. coli* als auch in *B. subtilis* funktionell [Gentz & Bujard, 1985; Le Grice, 1990] und eröffnet daher die Möglichkeit die Expression der klonierten Gene (im Vorfeld einer zeitaufwendigen Integration in das *B. subtilis*-Chromosom) zunächst in *E. coli* zu testen. Durch die Ko-Expression des Lac-Repressorgens *lacI* kann darüber hinaus in beiden Wirtsorganismen eine kontrollierte und auf die jeweilige Wachstumsphase abgestimmte Expression der klonierten Gene erzielt werden.

Die Rekonstitution des Bacitracin-Biosynthese-Systems erfordert das Zusammenspiel von insgesamt neun Proteinen (siehe Abb. 8.10). Während die Gene der drei Bacitracin-Synthetasen BacABC in einem Operon angeordnet sind, unterliegen

die anderen Gene der transkriptionellen Kontrolle weiterer Promotoren [Konz *et al.*, 1997; Neumüller *et al.*, 2001]. Während die Gene *bacTRS* unter der Kontrolle von σ_A -abhängigen Promotoren liegen, konnte bislang kein Promotor für *bcrABC* determiniert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression der kodierenden Gene des ABC-Transporters unter der regulativen Kontrolle des Zwei-Komponenten-Systems BacRS steht. Um eventuelle Störungen der System-inhärenten Regulation zu vermeiden, erfolgte die heterologe Expression des vollständigen Bacitracin-Biosynthese-Genclusters aus *B. licheniformis* unter der Verwendung der nativen, vermutlich σ_A -abhängigen Promotoren, deren Funktionalität im verwandten Wirt *B. subtilis* vorrausgesetzt wurde. Die Richtigkeit dieser Annahme konnte anhand der Charakterisierung des *B. subtilis*-Stammes KE360 erhalten werden, der in der Lage ist, neben den Bacitracin-Synthetasen BacABC, auch die Proteine des Zwei-Komponenten-Systems BacRS, sowie des ABC-Transporters BcrABC zu produzieren. Die Produktion der TypII-Thioesterase BacT konnte aufgrund des Fehlens geeigneter Antikörper leider nicht nachgewiesen werden.

Aufgrund der Verwendung von σ_A -abhängigen Promotoren unterliegt die heterologe Expression dieser Gene einer Wachstumsphasen-abhängigen Regulation. So konnte in *B. subtilis* die Produktion der genannten Proteine am Übergang der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase beobachtet werden. Dies ist konsistent mit der Regulation im nativen Produzenten *B. licheniformis* [Froyshov, 1977], wenngleich interessanterweise im heterologen Wirt *B. subtilis* eine erhöhte Produktionsrate der NRPSs beobachtet werden konnte.

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung eines Wachstumsphasen-abhängigen Promotors ist der Wegfall eines exogenen Induktors. Hierdurch kann bei der fermentativen Produktion von Bacitracin auf die Zugabe teurer Chemikalien wie z. B. IPTG verzichtet werden, wodurch auch ein ökonomischer Vorteil gegenüber anderen Expressionssystemen erreicht wird.

8.4.3 Posttranslationale Modifikation in *B. subtilis*

Ein weiteres Problem bei der heterologen Produktion von NRPSs stellt die posttranslationale Modifikation der Enzyme dar. Um eine vollständige Aktivität dieser multimodularen Enzyme zu erhalten, muss eine Konvertierung der inhärenten PCP-Domänen von ihrer inaktiven apo- in die aktive holo-Form erfolgen. Diese Reaktion wird von assoziierten PPTasen katalysiert, welche eine Übertragung des Ko-Faktors Ppant auf die PCP-Domänen des Enzyms ermöglichen [Lambalot *et al.*, 1996]. Die

kommerziell erhältlichen *E. coli* Stämme enthalten jedoch keine geeignete PPTase, die in der Lage wäre, die PCP-Domänen der NRPSs zu modifizieren, so dass die Enzyme in diesem Wirt in ihrer inaktiven apo-Form überproduziert werden [Walsh *et al.*, 1997]. Um dennoch eine biochemische Charakterisierung der in *E. coli* produzierten NRPSs zu ermöglichen, wurden zwei unterschiedliche Wege eingeschlagen. Zum einen ist es möglich, durch Inkubation der Enzyme mit einer PPTase und dem Ko-Substrat CoASH eine Modifikation der PCP-Domänen zu erreichen [Lambalot *et al.*, 1996]. Dieses Verfahren ist jedoch auf die *in vitro* Modifikation von NRPSs limitiert.

Um eine *in vivo* Modifikation der produzierten NRPSs im heterologen Wirt *E. coli* zu erreichen, wurden zum anderen Ko-Expressionssysteme für PPTasen konstruiert [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Hierbei trägt der heterologe Wirt *E. coli* in der Regel neben dem eigentlichen Plasmid, welches die genetische Information für die interessierende NRPS trägt, ein zweites Plasmid, welches das Gen einer spezialisierten PPTase enthält (z. B. *gsp* oder *sfp*). Bei der Verwendung solcher Ko-Expressionssysteme mussten jedoch häufig Probleme, wie z. B. eine unvollständige posttranslationale Modifikation der PCP-Domänen oder eine Instabilität des entsprechenden Zwei-Plasmid-Systems beobachtet werden.

Im nativen NRP-Produzenten *B. subtilis* hingegen ist eine chromosomale Kopie des assoziierten PPTase-Gens *sfp* des Surfactin-Biosynthese-Genklusters enthalten [Cosmina *et al.*, 1993]. Aufgrund seiner stabilen Integration in das *Bacillus*-Chromosomen kann hierbei ein Verlust der genetischen Information ausgeschlossen werden.

Für die *B. subtilis*-inhärente PPTase Sfp konnte in früheren Untersuchungen eine breite Substrat-Toleranz aufgezeigt werden [Quadri *et al.*, 1998]. So ist Sfp in der Lage, neben den PCP-Domänen der NRPSs auch die verwandten Acyl-Carrier-Protein (ACP) Domänen der Polyketidsythesen (PKSs) zu modifizieren. Aufgrund dieser breiten Substrat-Vielfalt des Sfps, scheint *B. subtilis* ein guter Kandidat für die heterologe Überproduktion funktionell aktiver, posttranslational-modifizierter holo-NRPSs und PKSs zu sein.

Die Analyse der posttranslationalen Modifikation von rekombinanten NRPSs in *B. subtilis* erfolgte am Beispiel des artifiziellen, dimodularen Proteins $C_{srfA-A1^-}$ (A_{Asp} -PCP-C- A_{Leu} -PCP) $_{srfA-B2-3}$. Während dieses Protein in *E. coli* in seiner inaktiven apo-Form produziert wird, kann aus *B. subtilis* ausschließlich posttranslational-modifiziertes Protein in seiner aktiven holo-Form erhalten werden. Da eine nachträgliche *in*

Anhand der vorhandenen Sequenzinformationen über den nativen Produzenten *B. licheniformis* ATCC 10716 konnten stromabwärts des Bacitracin-Biosynthese-Genclusters die Gene *bcrABC* determiniert werden, die an der Ausbildung der Bacitracin-Selbst-Resistenz beteiligt sind (siehe Abb. 8.10) [Neumüller *et al.*, 2001]. Die kodierten Proteine BcrABC fungieren als ABC-Transportersystem, wie anhand ihrer heterologen Produktion in *B. subtilis* und *E. coli* nachgewiesen werden konnte [Podlesek *et al.*, 2000; Podlesek *et al.*, 1995]. Die Produktion dieses ABC-Transporters ermöglicht den aktiven Export des Peptidantibiotikums und vermittelt auf diese Weise eine Selbst-Resistenz gegen Bacitracin. Die Expression von *bcrABC* wird von dem Zwei-Komponenten-System BacRS reguliert, dessen Gene stromaufwärts von *bcrABC* lokalisiert sind (siehe Abb. 8.10) [Neumüller *et al.*, 2001]. Während das Regulator-Protein BacR keine Auswirkungen auf die Expression des *bac*-Operons ausübt, agiert es in der Abwesenheit von Bacitracin als negativer Regulator der *bcrABC* Expression.

Bei der Konstruktion des heterologen Bacitracin-Produzenten *B. subtilis* KE360 musste also darauf geachtet werden, dass neben den Biosynthese-Genen *bacABC* auch eine Integration der Selbst-Resistenz-vermittelnden Gene *bacRS* und *bcrABC* erfolgte. Während beim Ausgangsstamm *B. subtilis* KE30 bereits eine Bacitracin-Konzentration von 20 IU/ml ausreichte, um eine Inhibition des Zellwachstums herbeizuführen, erfolgte eine Hemmung des Wachstums von *B. subtilis* KE360 (d.h. in Gegenwart des Bacitracin-spezifischen ABC-Transporters) erst ab 280 IU/ml. Durch die Ko-Expression von *bacRS* und *bcrABC* konnte somit eine Erhöhung der Bacitracin-Toleranz um den Faktor 14 erhalten werden, welche vergleichbar ist mit der Selbst-Resistenz des nativen Produzentenstammes *B. licheniformis* ATCC 10716.

8.4.5 Quantifizierung der Bacitracin-Produktion im heterologen Wirt *B. subtilis* KE360

In dieser Arbeit konnte die erfolgreiche Rekonstitution der Bacitracin-Biosynthese im heterologen Wirt *B. subtilis* KE360 erhalten werden. Eine Quantifizierung der Bacitracin-Produktion zeigte, dass der heterologe Wirt gegenüber dem nativen Produzenten *B. licheniformis* ATCC 10716 eine um 50% erhöhte Produktion von Bacitracin A aufweist (*B. licheniformis*: 5600 IU/L; *B. subtilis*: 8400 IU/L). Diese Steigerung der volumetrischen Produktivität lässt sich in erster Linie auf die erhöhte Wachstumsdichte von *B. subtilis* KE360 zurückführen. Erfolgt dagegen eine quanti-

tative Analyse mit einer Eichung auf die Zelldichte, so wird eine um 50% reduzierte Bacitracin-Produktion in *B. subtilis* KE360 (2800 IU/L bei OD₆₀₀ = 1) im Vergleich zum nativen Produzenten *B. licheniformis* (5600 IU/L bei OD₆₀₀ = 1) beobachtet. Diese effektive Reduktion der Produktivität pro Zelle muss - paradoxerweise - auf die erhöhte Expressionsrate der Bacitracin-Synthetase-Gene *bacABC* in *B. subtilis* KE360 zurückgeführt werden. Bei einer hohen Expressionsrate können Phänomene wie die Bildung von *inclusion bodies*, erhöhter Einbau von falschen Aminosäuren, sowie unvollständige oder falsche posttranslationale Modifikation nicht ausgeschlossen werden [Pfeifer & Khosla, 2001]. Folglich wird zwar eine erhöhte Proteinmenge erhalten, die jedoch zu Lasten der Proteinqualität und -aktivität geht.

Um eine Steigerung der Bacitracin-Produktion im heterologen Wirt *B. subtilis* zu erreichen, müssten die Bacitracin-Synthetase-Gene *bacABC* folglich unter die transkriptionelle Kontrolle eines schwächeren Promotors gestellt werden. Als Kandidat hierfür bietet sich der Promotor des Surfactin-Biosynthese-Genklusters (*P_{srfA}*) an, der im Vergleich zum *bacA*-Promotor eine deutlich schwächere Expression der unter seiner Kontrolle stehenden Gene vermittelt. In Analogie zum σ^A -abhängigen *bac*-Promotor, würde die Expression unter der Kontrolle des *srfA*-Promotors ebenfalls am Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase erfolgen [Marahiel *et al.*, 1993]. Darüber hinaus könnte bei der fermentativen Bacitracin-Produktion wiederum, aufgrund der *B. subtilis*-inhärenten Regulation der Gen-Expression, auf die Verwendung eines exogenen Induktors verzichtet werden.

8.4.6 Zusammensetzung des produzierten Bacitracin-Komplexes im heterologen Wirt *B. subtilis* KE360

Bei dem Peptidantibiotikum Bacitracin handelt es sich um ein Gemisch aus 15 zyklisch-verzweigten Dodecapeptiden mit unterschiedlicher Aminosäure-Zusammensetzung [Ikai *et al.*, 1992]. Variationen treten vorwiegend an den Positionen 3, 5, und 8 auf, und die Hauptprodukte stellen die Bacitracine A und F dar. Um eine qualitative Aussage über die Zusammensetzung der produzierten Peptide in *B. licheniformis* ATCC 10716 und *B. subtilis* KE360 zu treffen, wurden die synthetisierten Bacitracin-Komplexe mittels HPLC/MS analysiert. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Bacitracine A und F in beiden Extrakten die Hauptbestandteile darstellen. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Zusammensetzung des Komplexes alleine durch die Substrat-Selektivität der Bacitracin-Synthetasen determiniert wird

und von der unterschiedlichen Verfügbarkeit der Substrate in den beiden Wirten unabhängig ist.

Im Vergleich zu *B. licheniformis*, konnte in den Extrakten des heterologen Wirtes *B. subtilis* eine erhöhte Konzentration des Oxidationsproduktes Bacitracin F nachgewiesen werden. Während in *B. licheniformis* lediglich 7% des produzierten Peptidantibiotikums in der oxidierten Form vorliegen, konnten in den Extrakten aus *B. subtilis* 14% Bacitracin F nachgewiesen werden. Diese erhöhte Konzentration des Degradationsproduktes kann vermutlich auf die zelluläre Umgebung in *B. subtilis* KE360 zurückgeführt werden, welche offensichtlich eine verstärkte Oxidation von Bacitracin A fördert.

8.4.7 Funktion der NRPSs assoziierten TyplI-Thioesterase (TEII)

Stromaufwärts des Bacitracin-Operons liegt das NRPS-assoziierte Gen *bacT*, welches für eine TyplI-Thioesterase (TEII) kodiert [Konz, *et al.*, 1997]. Da die Gene homologer Proteine in der Nachbarschaft fast aller bakteriellen NRPS-Genkluster gefunden wurden, wurde eine Funktion der kodierten TEIIs während der NRP-Biosynthese postuliert. Dies konnte am Beispiel des Surfactin-Biosynthese-Genklusters aus *B. subtilis* ATCC 21332 gezeigt werden [Schneider & Marahiel, 1998]. In diesem System führte die Deletion des TEII-kodierenden Gens *srfA-TE* zwar nicht zum vollständigen Erliegen der Surfactin-Biosynthese, jedoch konnte eine drastische Reduktion der Surfactin-Produktion um 80% beobachtet werden.

Der Erhalt der vollständigen Aktivität von NRPSs erfordert die Konvertierung der PCP-Domänen von der inaktiven apo- in die aktive, phosphopantetheinylierte holo-Form. Diese posttranslationale Modifikation der NRPSs wird von den assoziierten PPTasen (z. B. Sfp, Gsp und Bli) katalysiert, für die eine breite Substrat-Selektivität gezeigt werden konnte [Quadri *et al.*, 1998]. Dies führt dazu, dass neben dem nativen Ko-Substrat CoASH auch diverse Acyl-CoA Derivate verwendet werden können. Diese biochemischen Informationen konnten anhand der aufgeklärten Kristallstruktur der PPTase Sfp verifiziert werden [Reuter *et al.*, 1999]. Anhand dieser Struktur wird das Substrat CoASH in einer gebogenen Konformation vom Enzym Sfp gebunden, wobei das Thiol-Ende des 4'-Phosphopantetheinyl-Armes von der CoASH-Bindungstasche wegzeigt und keine Interaktionen mit Sfp ausbildet. Aufgrund dieser Anordnung ist somit die spezialisierte PPTase Sfp nicht in der Lage zwischen den Substraten CoASH und Acyl-CoA zu unterscheiden.

In der Tat überwiegen in einer Zelle Acyl-CoA-Derivate gegenüber freiem CoASH [Vallari *et al.*, 1987], so dass es bei der *in vivo*-Modifikation quasi zwangsläufig zur Bildung inaktiver, acylierter PCP-Domänen kommen muss. Die Acyl-Gruppe blockiert die Thiol-Gruppe des Carrier-Proteins und verhindert so eine kovalente Bindung der als Aminoacyl-Adenylat aktivierten α -Aminosäure.

Kürzlich war es Herrn Dirk Schwarzer möglich, die biochemische Funktion der TypII-Thioesterasen aufzuklären [Schwarzer *et al.*, 2002]. Die assoziierten TypII-Thioesterasen sind in der Lage den Acyl-Thioester zu hydrolysieren und hierdurch eine Regeneration der blockierten PCP-Domänen zu katalysieren [Schwarzer *et al.*, 2002].

Die Blockierung einer einzelnen PCP-Domäne innerhalb des Biosynthese-Systems würde ausreichen, um ein vollständiges Erliegen der NRP-Produktion zu bewirken. Das Vorhandensein einer TypII-Thioesterase stellt demnach einen wichtigen Bestandteil für die effiziente NRP-Produktion dar. Um eine Blockierung der PCP-Domänen ausschließen zu können, wurde deshalb bei der Rekonstitution des Bacitracin-Biosynthese-Systems in *B. subtilis* darauf geachtet, dass neben den Genen der Bacitracin-Synthetasen auch *bacT* in das Chromosom integriert wird, welches für die TypII-Thioesterase des Bacitracin-Biosynthese-Genklusters kodiert. Die Produktion dieses Proteins konnte im heterologen Wirt aufgrund des Fehlens geeigneter Antikörper leider nicht nachgewiesen werden. Vor dem Hintergrund des gerade geschilderten Sachverhalts und in Anbetracht der effizienten Bacitracin-Produktion scheint die Expression des *bacT*-Gens in *B. subtilis* KE360 jedoch sehr wahrscheinlich.

8.5 Heterologe Expression in *B. subtilis* – ein Ausblick

Durch die Etablierung des neuen Wirtes *B. subtilis* für die heterologe Expression von NRPS-Genen, werden neue Möglichkeiten für die gerichtete Manipulation und biochemischen Charakterisierung dieser multifunktionellen Enzyme eröffnet.

Aufgrund seiner interessanten biologischen Aktivität, sowie zahlreicher struktureller Besonderheiten wie (i) einer zyklisch-verzweigten Struktur, (ii) eines N-terminalen Thiazolin-Ringes, (iii) des Einbaus der nichtproteinogenen Aminosäure Ornithin und dreier weiterer D-konfigurierter Aminosäuren stellt das Peptid-antibiotikum Bacitracin ein interessantes Modellsystem für die gerichtete Manipulation von NRPSs dar. Bislang wurde die Manipulation dieses Biosynthese-

Systems aufgrund der genetischen Unzugänglichkeit seines nativen Produzentenstammes *B. licheniformis* verwehrt. Aufgrund der Rekonstitution des Bacitracin-Biosynthese-Genclusters im genetisch zugänglichen Wirt *B. subtilis* steht es nun jedoch, neben dem *B. subtilis*-inhärenten Surfactin-Biosynthese-Operon, als weiteres Biosynthese-System für das rationale Design neuer NRP-Derivate zur Verfügung.

Neben der genetischen Manipulation natürlich-vorkommender NRPS-Biosynthese-Systeme besteht die Möglichkeit neuartige Peptide auch an artifiziellen Hybridsynthetasen zu generieren. So konnten mittels Modul-Fusionen funktionelle Hybridsynthetasen konstruiert werden, die in der Lage sind die Bildung von kurzen Di- und Tripeptiden *in vitro* zu katalysieren. Aufgrund der geschilderten Probleme bei der heterologen Expression von NRPS-Genen im heterologen Wirt *E. coli*, bestand hierbei jedoch eine Limitierung auf trimodulare Systeme. Für größere NRPS wurde bislang keine erfolgreiche Expression berichtet [Symmank, *et al.*, 1999]. Anhand der Rekonstitution des Bacitracin-Biosynthese-Genclusters konnte dagegen gezeigt werden, dass *B. subtilis* durchaus in der Lage ist selbst pentamodulare Synthetasen wie BacA (598 kDa) und BacC (723 kDa) in einer löslichen, stabilen und aktiven holo-Form zu produzieren. Die Etablierung der heterologen Expression von NRPS-Genen in dem Wirt *B. subtilis* eröffnet somit die Möglichkeit, auch größere, multimodulare NRPS-Hybridsysteme für das rationale Design von NRPs zu konstruieren. Neben den Untersuchungen von NRPS-Genen könnte sich *B. subtilis* jedoch - aufgrund des im Vergleich zu *E. coli* unterschiedlichen Kodon-Gebrauchs – auch als vorteilhaft für die heterologe Expression einer Vielzahl von weiteren Genen erweisen [Kuhlmann & Bremer, 2002].

9 Anhang

9.1 Konstruierte Stämme und Plasmide

Tab. 9.1: Auflistung der in dieser Arbeit konstruierten *B. subtilis* Stämme

<i>B. subtilis</i> -Stamm	Genotyp
KE90	Φ (<i>yckH-kan-comS-P_{T5}-srfA-A1(C)-srfA-B2-3(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)-his₆-ycxA</i>) (<i>amyE'-cat-P_{spac}-comS-lacI-'amyE</i>)
KE100	Φ (<i>srfA-B2(His322Glu)</i>)
KE150	Φ (<i>yckH-comS-cat-srfA-A2</i>)
KE160	Revertante vom Wildtyp <i>B. subtilis</i> ATCC 21332
KE300	Φ (<i>yckH-comS-bacT-kan-'bacB2'-ycxA</i>) (<i>amyE'-cat-P_{spac}-comS-lacI-'amyE</i>)
KE310	Φ (<i>yckH-comS-bacT-bacA'-erm-'bacB'-ycxA</i>) (<i>amyE'-cat-P_{spac}-comS-lacI-'amyE</i>)
KE320	Φ (<i>yckH-comS-bacT-bacA-bacB'-kan-'bacB'-ycxA</i>) (<i>amyE'-cat-P_{spac}-comS-lacI-'amyE</i>)
KE340	Φ (<i>yckH-comS-bacT-bacA-C-bacR'-erm-'bcrABC-ycxA</i>) (<i>amyE'-cat-P_{spac}-comS-lacI-'amyE</i>)
KE350	Φ (<i>yckH-comS-bacT-bacA-C-bacR'-kan-'bacS-bcrABC-ycxA</i>) (<i>amyE'-cat-P_{spac}-comS-lacI-'amyE</i>)
KE360	Φ (<i>yckH-comS-bacT-bacA-C-bacRS-bcrABC-ycxA</i>) (<i>amyE'-cat-P_{spac}-comS-lacI-'amyE</i>)
SD10	Φ (<i>yckH-kan-comS-P_{T5}-srfA-A1(C)-srfA-B2-3(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)-ycxA</i>) (<i>amyE'-cat-P_{spac}-comS-lacI-'amyE</i>)

Tab. 9.2: Auflistung der in dieser Arbeit konstruierten und verwendeten Plasmide (Zwischenstufen sind nicht gesondert aufgeführt).

Plasmid	Beschreibung
pAspA(H322E, I330V)	pQE60- <i>aspA(srfA-B2)</i> (H322E, I330V)
pAspA(H322E, V299I)	pQE60- <i>aspA(srfA-B2)</i> (H322E, V299I)
pAspA (H322E, V299I, I330V)	pQE60- <i>aspA(srfA-B2)</i> (H322E, V299I, I330V)
phomoAsp(H322E)	pBluescriptII SK(-)- <i>srfA-B2</i> (H322E)
pCA _{Glu} PCP	pQE60- <i>srfA-A1</i>
pCA _{Glu} PCP(K239Q)	pQE60- <i>srfA-A1</i> (K239Q)
pΔ <i>srfA-A1</i>	pBluescriptII SK(-)- <i>yckGH-comS-cat-srfA-A2</i>
phomoGluCAPCP(K239Q)	pBluescriptII SK(-)- <i>yckGH-srfA-A1</i> (K239Q)- <i>srfA-A2</i>
pSD193	pBluescriptII SK(-)- <i>yckGH-kan-comS-P_{T5}-MCS-ycxA'</i> MCS: <i>NcoI</i> , <i>SphI</i> , <i>BamHI</i>
pSD270	pBluescriptII SK(-)- <i>yckGH-kan-comS-P_{T5}-MCS-his₆-ycxA'</i> MCS: <i>NcoI</i> , <i>SphI</i> , <i>HpaI</i> , <i>BamHI</i>
pKE151	pBluescriptII SK(-)- <i>yckGH-kan-comS-P_{T5}-MCS-ycxA'</i> MCS: <i>NdeI</i> , <i>SphI</i> , <i>PacI</i>
pKE170	pBluescriptII SK(-)- <i>yckGH-kan-comS-P_{T5}-MCS-his₆-ycxA'</i> MCS: <i>NdeI</i> , <i>SphI</i> , <i>NheI</i> , <i>BamHI</i>
pSD197	pBluescriptII SK(-)- <i>yckGH-kan-comS-P_{T5}-srfA-A1(C)-srfA-B2-3(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)-ycxA'</i>
pKE203	pBluescriptII SK(-)- <i>yckGH-kan-comS-P_{T5}-srfA-A1(C)-srfA-B2-3(A_{Asp}-PCP-C-A_{Leu}-PCP)-(his₆)-ycxA'</i>
pKE64	pBluescriptII SK(-)- <i>yckGH-comS-bacT-kan-'bacB-ycxA'</i>
pKE78	pBluescriptII SK(-)- <i>yckGH-comS-bacTA'-kan-'bacB-ycxA'</i>
pKE110	pBluescriptII SK(-)- <i>bacB'-erm-bcrABC-ycxA'</i>

9.2 Sequenzalignments und Homologie-Vergleiche

9.2.1 Analyse der vollständigen Asp- und Asn-selektiven A-Domänen

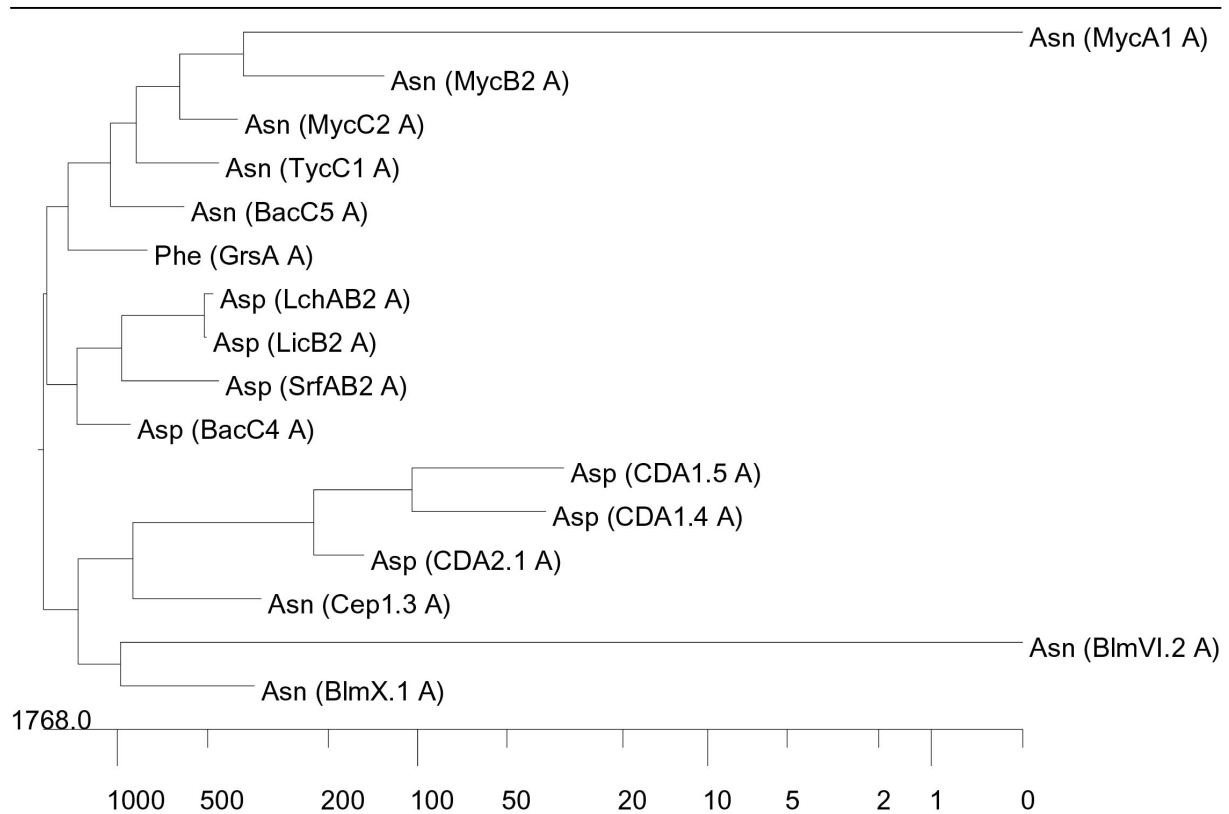


Abb. 9.1: Phylogenetische Verwandtschaft der vollständigen Asp/Asn-selektiven A-Domänen
Für die Erstellung des phylogenetischen Baumes wurden die vollständigen Aminosäure-Sequenzen (ca. 550 Aminosäuren) aller bislang bekannten Asp- und Asn-selektiven A-Domänen miteinander verglichen (nach Jotun Hein [Hein, 1990]). Als interner Standard diente die Sequenz der L-Phe-aktivierenden A-Domäne PheA.

Tab. 9.3: Sequenz-Ähnlichkeiten innerhalb der vollständigen Asp- und Asn-selektiven A-Domänen

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
	41.4	38.2	39.2	36.3	34.9	36.4	35.0	42.4	29.4	31.9	34.1	42.3	42.7	41.7	44.6	1	Phe (GrsA A)
		47.6	47.9	48.1	36.8	36.7	36.7	45.6	31.8	35.3	35.9	42.8	43.2	44.5	41.6	2	Asp (BacC4 A)
			98.0	56.0	37.2	37.2	36.4	41.1	31.0	35.6	37.4	38.8	38.9	37.8	38.6	3	Asp (LchAB2 A)
				56.4	38.1	38.0	37.2	41.7	31.8	36.0	38.0	39.0	39.1	38.2	39.0	4	Asp (LicB2 A)
					40.5	40.3	39.9	40.6	33.6	37.0	39.6	42.6	41.5	42.4	38.7	5	Asp (SrfAB2 A)
						89.7	91.3	43.2	38.4	38.6	49.5	40.2	39.5	39.1	40.8	6	Asp (CDA2.1 A)
							91.6	42.7	38.5	38.3	49.4	40.5	39.0	39.3	41.7	7	Asp (CDA1.5 A)
								43.7	37.7	38.7	49.8	40.1	38.6	39.5	41.1	8	Asp (CDA1.4 A)
									33.9	39.4	40.6	53.2	55.0	55.7	55.1	9	Asn (BacC5 A)
										43.1	39.9	35.6	35.5	34.2	33.7	10	Asn (BlmX.1 A)
											40.3	37.0	37.1	37.4	37.0	11	Asn (BlmVI.2 A)
												41.3	40.4	42.8	40.1	12	Asn (Cep1.3 A)
													68.4	61.9	52.4	13	Asn (MycA1 A)
														65.1	52.8	14	Asn (MycB2 A)
															54.6	15	Asn (MycC2 A)
																16	Asn (TycC1 A)



9.2.4 Analyse der Proteinregion zwischen den Core-Sequenzen A4 und A5 der Glu- und Gln-selektiven A-Domänen

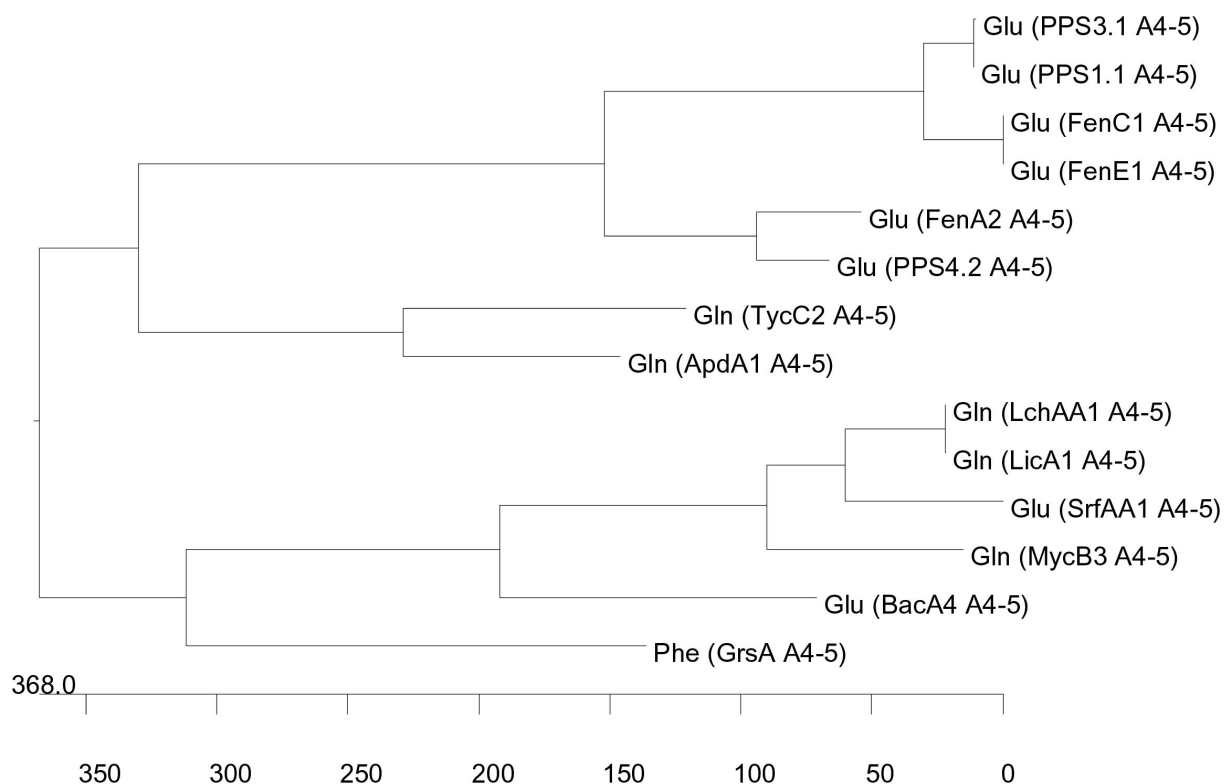


Abb. 9.5: Phylogenetische Verwandtschaft der Glu/Gln-selektiven A-Domänen in der Region zwischen Core A4 und A5

Für die Erstellung des phylogenetischen Baumes wurden die 100 Aminosäuren-umfassende Region zwischen Core A4 und A5 aller bislang bekannten Glu- und Gln-selektiven A-Domänen miteinander verglichen (nach Jotun Hein [Hein, 1990]). Als interner Standard diente die Sequenz der L-Phe-aktivierenden A-Domäne PheA.

Tab. 9.6: Sequenz-Ähnlichkeiten Glu- und Gln-selektiven A-Domänen in der Region zwischen Core A4 und A5

% Ähnlichkeit														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
	31.7	27.6	27.6	33.7	33.7	31.7	31.7	31.7	29.7	31.7	31.7	33.7	37.6	1
		53.7	53.7	50.5	50.5	85.7	36.5	25.0	27.9	27.9	27.9	25.0	36.8	2
			100.0	85.2	85.2	55.6	35.6	29.7	33.7	30.7	30.7	28.7	37.9	3
				85.2	85.2	55.6	35.6	29.7	33.7	30.7	30.7	28.7	37.9	4
					99.1	52.3	37.5	28.8	30.8	28.8	28.8	29.8	37.7	5
						52.3	37.5	28.8	30.8	28.8	28.8	29.8	37.7	6
							36.5	26.0	26.9	26.9	26.9	26.9	37.7	7
								32.7	38.5	36.5	36.5	35.6	55.1	8
									50.5	46.8	46.8	49.5	26.9	9
										69.4	69.4	61.3	28.8	10
											100.0	66.7	30.8	11
												66.7	30.8	12
													32.7	13
														14

Phe (GrsA A4-5)
Glu (FenA2 A4-5)
Glu (FenC1 A4-5)
Glu (FenE1 A4-5)
Glu (PPS1.1 A4-5)
Glu (PPS3.1 A4-5)
Glu (PPS4.2 A4-5)
Gln (ApdA1 A4-5)
Glu (BacA4 A4-5)
Glu (SrfAA1 A4-5)
Gln (LchAA1 A4-5)
Gln (LicA1 A4-5)
Gln (MycB3 A4-5)
Gln (TycC2 A4-5)



9.3 Der erweiterte Selektivitäts-vermittelnde Kode von NRPS A-Domänen

Tab. 9.7: Der elf Aminosäuren-umfassende Kode der NRPS A-Domänen
Variable Positionen sind in rot hervorgehoben.

Selektivität	Position											Herkunft
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	332	517	
3-hPip	N	F	C	S	Q	G	V	L	T	F	K	SnbA
3-MeAsp	D	A	R	H	V	G	I	F	V	K	K	McyB2
3-MeGlu	D	Q	G	K	T	G	V	G	H	C	K	CDA3.1
3-pAsp	D	A	T	K	V	G	E	V	G	C	K	CDA2.3
4-Mha	N	M	M	Y	V	G	V	L	I	A	K	AcmA
4-oPip	D	F	Q	F	L	G	V	A	V	T	K	SnbDE3
Aad (1)	E	P	R	N	I	V	E	F	V	T	K	AcvA1
Aad (2)	D	P	R	H	F	V	M	R	S	V	K	Lys1+, Lys2
Abu (1)	D	A	W	F	H	A	V	A	Y	S	K	CssA6
Abu (2)	D	T	Y	W	W	G	G	T	F	A	K	SnbC2
Aeo	D	V	L	L	C	T	G	I	M	S	K	Hts1.4
AHBA	S	L	A	A	L	G	A	G	A	I	K	RifA
Ahp	D	V	E	N	A	G	V	V	T	A	K	ApdB2
Ala (1)	D	L	F	N	N	A	L	T	Y	A	K	BlmIX, MycA2
Ala (2)	D	V	F	I	Y	A	A	I	L	S	K	CssA11
Ala (3)	D	V	W	C	I	A	A	I	Y	A	K	Mps3
Ala (4)	D	A	G	G	C	A	M	V	A	C	K	Hts1.2
Ala (5)	D	L	F	V	C	G	G	P	L	G	K	Cps1.1
Ala (6)	D	M	I	S	A	C	C	L	I	V	K	SafB1
alloThr	D	Y	W	S	V	G	M	V	H	A	K	Mps2
Arg (1)	D	V	W	T	I	G	A	V	D	A	K	McyC
Arg (2)	D	V	A	D	V	G	A	I	D	S	K	SyrE5
Asn	D	L	T	K	I	G	E	V	G	C	K	BacC5, BlmVI2, BlmX1, CepA3, MycA, MycB2, MycC2, TycC1,
Asp (1)	D	L	T	K	V	G	H	I	G	A	K	BacC5, LchAB2, LicB2, SrfAB2

Selektivität	Position											Herkunft	
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	332	517		
Asp (2)	D	L	T	P	I	G	A	V	N	I	K	CDA1.4, CDA2.1	CDA1.5,
β-Ala (1)	V	D	W	V	I	S	L	A	D	A	K	BlmIV.1	
β-Ala (2)	D	G	T	L	I	S	S	G	D	V	K	FxbB2	
Bmt	D	A	W	T	Y	G	G	V	I	S	K	CssA5	
Cys (1)	D	H	E	S	D	V	G	I	T	T	K	AcvA2	
Cys (2)	D	L	Y	N	L	S	L	I	W	S	K	AngR, BacA2, BlmIV.2, EpoP, HMWP2, PchE, PchF	
Dab	D	L	E	H	N	T	T	V	S	C	K	SyrE3	
D-Ala (1)	D	L	W	F	Y	I	A	V	V	S	K	CssA1	
D-Ala (2)	D	L	M	V	L	C	T	V	A	V	K	DaeI	
D-Ala (3)	D	L	M	C	Y	D	A	V	A	L	K	Glg1.1	
D-Ala (4)	D	L	L	F	G	I	S	V	L	V	K	Hts1.1	
D-Dab	D	L	E	T	N	T	T	V	S	C	K	SyrE4	
D-Leu	D	A	F	Y	L	G	M	M	C	A	K	CepA1	
D-Ser	D	V	W	H	L	S	L	I	D	V	K	SyrE2	
DHB	N	Y	S	A	Q	G	V	V	N	Y	K	DhbE, EntE, MyxE, VibE	
Dh-Phg	D	P	Y	H	G	G	T	L	C	A	K	CepC	
Dh-Thr	D	F	W	N	V	G	M	V	H	A	K	SyrE7	
(Ac)DMAP	D	A	W	T	I	A	A	V	C	A	K	SnbDE2, SnbDE2 ^{SV}	
DMPt	G	F	A	Y	Y	G	G	L	T	R	K	PhsA	
Gln (1)	D	A	Q	D	L	G	V	V	D	A	K	LchAA1, LicA1, MycB3	
Gln (2)	D	A	W	Q	F	G	G	V	D	A	K	ApdA1, TycC2	
Glu (1)	D	A	K	D	L	G	V	V	D	A	K	SrfAA1, BacA4	
Glu (2)	D	A	W	H	F	G	G	V	D	A	K	FenA2, FenC1, FenE1, PPS1.1, PPS3.1, PPS4.2	
Gly (1)	D	I	L	Q	L	G	L	I	W	S	K	AcmC2, CDA2.2, DhbF, NosC2, TA1	

Selektivität	Position											Herkunft
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	332	517	
Gly (2)	D	I	Q	M	F	V	A	M	Q	S	K	CssA7
Gly (3)	D	L	F	N	N	A	L	T	Y	S	K	SafB2
HAsp	D	M	I	D	L	G	M	V	D	A	K	SyrE8
His (1)	D	S	E	L	T	A	E	V	C	S	K	BacC3
His (2)	D	S	A	L	I	A	E	V	W	S	K	BlmX.2
Hiv	G	A	L	H	V	V	G	S	I	C	K	EsynA1
Homo-Tyr	D	L	A	F	S	G	A	V	A	A	K	ApdB1
hPhg (1)	D	V	Y	H	L	G	L	L	C	V	K	CDA1.6
hPhg (2)	D	I	F	H	T	G	L	L	C	A	K	CepB1, CepB2
Ile (1)	D	A	F	F	L	G	V	T	F	A	K	ApdD, NosA1
Ile (2)	D	G	F	F	L	G	V	V	Y	A	K	BacA1, BacA5, BacC1, LchAC, LicC
Ile (3)	D	A	F	F	Y	G	I	T	F	S	K	PPS5.1, FenB1
Ile (4)	D	A	F	T	N	C	G	V	F	S	K	CmaA
Leu (1)	D	A	W	F	L	G	N	V	V	A	K	BacA3, LchAA3, LchAB3, LicA3, LicB3, MycB1, NosA4, NosC1, SrfAA3, SrfAB3,
Leu (2)	D	A	W	L	Y	G	A	V	M	S	K	CssA2, CssA3, CssA8, CssA10
Leu (3)	D	G	A	Y	T	G	E	V	V	T	K	GrsB4, TycC6
Leu (4)	D	A	F	M	L	G	M	V	F	T	K	LchAA2, LicA2, SrfAA2
Leu (5)	D	A	F	F	L	G	C	V	F	A	K	SrfAC
Lys (1)	D	A	E	S	I	G	S	V	C	A	K	BacB1
Lys (2)	D	V	A	H	P	G	F	I	N	A	K	MbtE
Lys (3)	D	A	W	D	A	G	C	V	E	A	K	MbtF
Lys (4)	D	A	E	D	I	G	T	V	V	A	K	MyxG
MdhA	D	V	W	H	F	S	L	I	D	V	K	McyA1
Me-Pro	D	V	Q	F	I	A	H	L	A	T	K	NosA3
Orn (1)	D	V	G	E	I	G	S	I	D	S	K	BacB2, FenC2, GrsB3, PPS1.2, TycC5
Orn (2)	D	I	N	Y	W	G	G	I	G	V	K	FxbB1

Selektivität	Position											Herkunft
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	332	517	
Orn-(δ)	D	M	E	N	L	G	L	I	N	T	K	FxbC1, FxbC3
Phe (1)	D	A	F	T	V	A	A	V	C	A	K	BacC2
Phe (2)	D	A	W	T	I	A	A	I	C	A	K	GrsA, TycA
Phe (3)	D	A	W	T	A	V	A	I	C	V	K	Mps1
Phe (4)	D	A	P	I	M	G	G	T	C	A	K	SyrE6
Phe (5)	D	A	L	V	M	G	A	V	M	A	K	TycB2
Phe (6)	D	A	W	T	I	A	A	V	C	A	K	TycB3
Phg	D	I	F	L	W	G	L	L	G	C	K	SnbDE4
Pip	D	Y	Q	Y	C	G	H	L	I	T	K	FkbP, RapP
Pro (1)	D	V	Q	F	A	A	H	V	V	T	K	AcmC1, MycB4, SnbDE1, VirgA1
Pro (2)	D	V	Q	F	I	A	H	V	V	T	K	FenA1, GrsB1, MycB4, NosD2, PPS4.1, TycB1
Pro (3)	D	I	A	V	I	T	V	L	I	T	K	Hts1.1
Sal	N	F	C	A	Q	G	V	L	C	F	K	MbtA, PchA, YbtE
Ser	D	V	W	H	F	S	L	V	D	V	K	BlmV1.1, CDA1.1, EntF, MycC1, NosA2, SyrE1,
Ser/Thr	D	M	L	N	A	G	L	V	H	A	K	MbtB
Thr (1)	D	F	W	N	I	G	M	V	H	V	K	AcmB1, ApdA2,B3, CDA1.2, FenD2, FxbC2 PPS2.2, PyoD1,2, SnbC1
Thr (2)	D	F	W	S	L	G	M	I	H	V	K	BlmVII
Thr (3)	D	I	L	Q	L	G	L	I	W	S	K	DhbF1
Thr (4)	D	F	W	S	A	R	M	V	H	T	K	SyrB
Thr (5)	D	L	T	V	A	G	L	I	W	S	K	DhbF
Thr (6)	D	V	W	H	L	S	L	V	D	V	K	Micx.x
Trp	D	A	W	S	V	G	S	V	C	S	K	CDA1.3, CDA3.2
Tyr (1)	D	A	S	T	I	A	A	V	C	A	K	ApdB4, NosD1
Tyr (2)	D	A	S	T	L	G	A	I	C	S	K	CepB3
Tyr (3)	D	T	S	K	V	A	A	I	C	A	K	CepA2

Selektivität	Position											Herkunft
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	332	517	
Tyr (4)	D	G	T	I	T	A	E	V	A	T	K	FenA3, FenD1, PPS2.1, PPS4.3
Tyr (5)	D	A	L	T	T	G	E	V	V	A	K	MycB1, TycC3
Tyr (6)	D	I	L	Q	L	G	L	V	W	S	K	SafA1
Tyr (7)	D	P	W	G	L	G	L	I	D	A	K	SafA2
Val (1)	D	A	Y	F	W	G	V	T	F	A	K	AcmB2, AcmC3
Val (2)	D	F	E	S	T	A	A	V	Y	N	K	AcvA3
Val (3)	D	A	W	M	F	A	A	I	L	S	K	CssA4, CssA9
Val (4)	D	G	W	F	I	G	I	I	I	S	K	EsynA2
Val (5)	D	A	F	W	I	G	G	T	F	S	K	FenE2, GrsB2, LchAB1, LicB1, PPS3.2, SrfAB1, TycC4

Die Substrat-Aminosäuren sind anhand ihres Drei-Buchstaben-Kodes angegeben. Die Modifikationen der Aminosäuren sind nach folgendem Schema angegeben: *allo*, allo-Konfiguration, β -, Amino-Gruppe an C_β ; D, D-Konfiguration; δ -, Peptidbindung über C_δ ; Me, N-Methyl-; h, Dehydro-; Homo, Insertion von CH_2 -Gruppe hinter C_α , o, O-Phospho-.

Abkürzungen der nichtproteinogenen Aminosäuren und Hydroxy-Carbonsäuren: 4-MHA, 4-Methyl-3-Hydroxy-Anthrallinat; Aad, Aminoadipin-Säure; Abu, 4-Amino-Butyrat; AcDMPt, N-Acetyl-Demethyl-PhosphothricinAeo, 2-Amino-8-Oxo-9,10-Epoxy-Decansäure; AHBA, 3-Amino-5-Hydroxy-Benzoat; Ahp, 3-Amino-6-Hydroxy-2-Piperidon; Bmt, 4-(2-Butenyl)-4-Methyl-Threonin; Dab, 2,4-Diamino-Butyrat; DHB, 2,3-Dihydroxy-Benzoat; Dh-Thr, Dehydro-Threonin; DhPhg, 2,4-Dihydroxy-Phenylglycin; DMAP, 4-Dimethylamino-Phenylalanin; DMPt, Demethyl-Phosphothricin; HAsp, β -Hydroxy-Aspartat; Hiv, 2-Hydroxy-Isovalerat; hPhg, 4-Hydroxy-Phenylglycin; MdHA, N-Methyl-Dehydro-Alanin; Phg, Phenylglycin; Pip, Pipecolat; Sal, Salicylat.

9.4 Hochkonservierte Core-Motive der strukturell eigenständigen Domänen von NRPS

Tab. 9.8: Sequenz-Motive der Core-Domänen

Die ehemalige Nomenklatur ist in Klammern angegeben

Domäne	Core-Motiv	Konsensus-Sequenz
Adenylierungs-(A)-Domäne	A1	L(TS)YxEL
	A2 (Core 1)	LKAGxAYL(VL)P(LI)D
	A3 (Core 2)	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG
	A4	FDxS
	A5	NxYGPTEx
	A6 (Core 3)	GELxIxGxG(VL)ARGYL
	A7 (Core 4)	Y(RK)TGDL
	A8 (Core 5)	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE
	A9	LPxYM(IV)P
	A10	NGK(VL)DR
Peptidyl-Carrier-Protein (PCP)-Domäne	T (Core 6)	DxFFxxLGG(HD)S(LI)
Kondensations-(C)-Domäne	C1	SxAQxR(LM)(WY)XI
	C2	RHExLRTxF
	C3 (His)	MHHxISDG(WV)S
	C4	YxD(FY)AVW
	C5	(IV)GxFVNT(QL)(CA)Xr
	C6	(HN)QD(YV)PFE
	C7	RDxSRNPL
Thioesterase-(Te)-Domäne	TE	G(HY)SxG

Tab. 9.9: Sequenz-Motive der optionalen Domänen
 Die ehemalige Nomenklatur ist in Klammern angegeben

Domäne	Core-Motiv	Konsensus-Sequenz
Epimerisierung-(E)-Domäne	E1	PIQxWF
	E2 (His)	HHxISDG(WV)S
	E3 (Race A)	DxLLxAxG
	E4 (Race B)	EGHGRE
	E5 (Race C)	RTVGWFTxxYP(YV)PFE
	E6	PxxGxGYG
	E7 (Race D)	FNYLG(QR)
Heterozyklisierung-(Cy)-Domäne	Cy1	FLP(TS)xxQxAYxxGR
	Cy2	RHx(IM)L(PAL)x(ND)GxQ
	(C3)	(DNR)4xDxxS
	Cy3	(LI)Pxx(PAL)x(LPF)P
	Cy4	(TS)(PA)3x(LAF)6x(IVT)LxxW
	Cy5	(GA)(DQN)FT
	Cy6	P(IV)VF(TA)SxL
	Cy7	QVx(LI)Dx(QH)11xW(DYF)
N-Methylierungs-(M)-Domäne	M1 (SAM)	VL(DE)GxGxG
	M2	NELSxYRYxAV
	M3	VExSxARQxGxLD
Oxidations-(Ox)-Domäne	Ox1	KYxYxSAGxxYPVQTYL
	Ox2	EAGxMAQLLMxxA4xIGLC

10 Literaturverzeichnis

- Alting-Mess, M. A. & Short, J. M.** (1989). pBluescript II: Multifunctional cloning and mapping vector. *Nucleic Acids Res.* **17**, 9494.
- Antoniewski, C., Savelli, B. & Stragier, P.** (1990). The *spoIIJ* gene, which regulates early developmental steps in *Bacillus subtilis*, belongs to a class of environmentally responsive genes. *J. Bacteriol.* **172**, 86-93.
- Arima, K., Kakinuma, A. & Tamura, G.** (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 488-494.
- Arthur, M. & Courvalin, P.** (1993). Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1563-1571.
- Azevedo, E. C., Rios, E. M., Fukushima, K. & Campos-Takaki, G. M.** (1993). Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. Extraction, purification, and characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **42**, 1-7.
- Belshaw, P. J., Walsh, C. T. & Stachelhaus, T.** (1999). Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* **284**, 486-489.
- Bennett, J. & Scott, K. J.** (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal. Biochem.* **43**, 173-182.
- Bischoff, R. & Kolbe, H. V.** (1994). Deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins and peptides: structural determinants and analytical methodology. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **662**, 261-278.
- Borchert, S., Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A.** (1994). Induction of surfactin production in *Bacillus subtilis* by *gsp*, a gene located upstream of the gramicidin S operon in *Bacillus brevis*. *J. Bacteriol.* **176**, 2458-2462.
- Bouvier, J., Pugsley, A. P. & Stragier, P.** (1991). A gene for a new lipoprotein in the *dapA-purC* interval of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **173**, 5523-5531.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bron, S., Meijer, W., Holsappel, S. & Haima, P.** (1991). Plasmid instability and molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* **142**, 875-883.
- Bruner, S. D., Weber, T., Kohli, R. M., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., Walsh, C. T. & Stubbs, M. T.** (2002). Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure (Camb)* **10**, 301-310.

- Brunner, R.** (1965). Polypeptide. In *Die Antibiotika*, pp. 167-214. Edited by R. Brunner & G. Machek. Nürnberg, Deutschland: Verlag Carl.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I. & Häuptle, M. T. D. B.** (1987). A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol.* **155**, 416-433.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M.** (1987). XL1Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA E. coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-379.
- Burnette, N.** (1981). Western Blotting: electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Cane, D. E., Walsh, C. T. & Khosla, C.** (1998). Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **282**, 63-68.
- Challis, G. L., Ravel, J. & Townsend, C. A.** (2000). Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* **7**, 211-224.
- Conti, E., Franks, N. P. & Brick, P.** (1996). Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**, 287-298.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A. & Brick, P.** (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J.* **16**, 4174-4183.
- Cooper, D. G., Macdonald, C. R., Duff, S. J. B. & Kosaric, N.** (1981). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 408-412.
- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G. & van Sinderen, D.** (1993). Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **8**, 821-831.
- Cox, R. A.** (1968). The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* **12B**, 120-129.
- Cutting, S. M. & Vander Horn, P. B.** (1990). Genetic analysis. In *Molecular biological methods for Bacillus*, pp. 34. Edited by C. R. Harwood & S. M. Cutting. Chichester, UK: John Wiley and Sons.
- D'Souza, C., Nakano, M. M. & Zuber, P.** (1994). Identification of *comS*, a gene of the *srfA* operon that regulates the establishment of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 9397-9401.
- Davies, J.** (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**, 375-382.
- de Ferra, F., Rodriguez, F., Tortora, O., Tosi, C. & Grandi, G.** (1997). Engineering of peptide synthetases. Key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant peptides. *J. Biol. Chem.* **272**, 25304-25309.

- Dieckmann, R., Lee, Y. O., van Liempt, H., von Dohren, H. & Kleinkauf, H.** (1995). Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett.* **357**, 212-216.
- Dieckmann, R., Pavela-Vrancic, M., von Dohren, H. & Kleinkauf, H.** (1999). Probing the domain structure and ligand-induced conformational changes by limited proteolysis of tyrocidine synthetase 1. *J. Mol. Biol.* **288**, 129-140.
- Doekel, S. & Marahiel, M. A.** (2000). Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *Chem. Biol.* **7**, 373-384.
- Doekel, S., Eppelmann, K. & Marahiel, M. A.** (2002). Heterologous expression of nonribosomal peptide synthetases in *B. subtilis*: Construction of a bi-functional *B. subtilis* / *E. coli* shuttle vector system. *FEMS Microbiol. Lett.* **in press**.
- Du, L., Sanchez, C., Chen, M., Edwards, D. J. & Shen, B.** (2000). The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC 15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chem. Biol.* **7**, 623-642.
- Dubnau, D.** (1991). Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Reviews* **55**, 395-424.
- Duitman, E. H., Hamoen, L. W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F. & Vater, J.** (1999). The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 13294-13299.
- Ehmann, D. E., Trauger, J. W., Stachelhaus, T. & Walsh, C. T.** (2000). Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **7**, 765-772.
- Ehrlich, S. D., Noirot, P., Tetit, M. A., Janni re, L., Michel, B. & te Riele, H.** (1986). Structural instability of *Bacillus subtilis* plasmids. *Genet. Eng.* **8**, 71-83.
- Eppelmann, K., Doekel, S. & Marahiel, M. A.** (2001). Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **276**, 34824-34831.
- Eppelmann, K., Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A.** (2002). Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry* **41**, 9718-9726
- Fabret, C., Ehrlich, D. S. & Noirot, P.** (2001). Positive selection for the loss of a gene in *Bacillus subtilis*: its application to functional genomics. *Poster, Conference of Bacilli, San Diego, USA*.
- Feignier, C., Besson, F. & Michel, G.** (1996). Characterization of iturin synthetase in the wild-type *Bacillus subtilis* strain producing iturin and in an iturin deficient mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**, 117-122.
- Froyshov, O.** (1977). The production of bacitracin synthetase by *Bacillus licheniformis* ATCC10716. *FEBS Lett.* **81**, 315-318.

- Froyshov, O.** (1984). The bacitracins: Properties, biosynthesis, and fermentation. In *Biochemistry of industrial antibiotics*. Edited by E. J. Vandamme. New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Gaidenko, T. A. & Khaikinson, M.** (1988). Cloning of genes controlling the biosynthesis of bacitracin in *Bacillus licheniformis*. *Mol. Gen. Microbiol. Virusol.* **2**, 24-28.
- Galli, G., Rodriguez, F., Cosmina, P., Pratesi, C., Nogarotto, R., de Ferra, F. & Grandi, G.** (1994). Characterization of the surfactin synthetase multi-enzyme complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1205**, 19-28.
- Gentz, R. & Bujard, H.** (1985). Promoters recognized by *E. coli* RNA polymerase selected by function: Highly efficient promoters from bacteriophage T5. *J. Bacteriol.* **164**, 70-77.
- Gocht, M. & Marahiel, M. A.** (1994). Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.* **176**, 2654-2662.
- Grabley, S. & Thiericke, R.** (1999). Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **64**, 101-154.
- Grevers, W., Kleinkauf, H. & Lipmann, F.** (1968). The activation of amino acids for the biosynthesis of gramicidin S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **60**, 269-276.
- Guerout-Fleury, A. M., Shanzand, K., Frandsen, N. & Stragier, P.** (1995). Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167**, 335-336.
- Haavik, H. I. & Froyshov, O.** (1975). Function of peptide antibiotics in producer organisms. *Nature* **254**, 79-82.
- Haese, A., Schubert, M., Herrmann, M. & Zocher, R.** (1993). Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing N-methyldepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*. *Mol. Microbiol.* **7**, 905-914.
- Halls, G.** (1999). *The complete guide to antiinfectives*: PJB Publications Ltd and Gerry Halls, Medical marketing services.
- Hein, J. J.** (1990). Unified approach to alignment and phylogenies. *Methods Enzymol.* **183**, 626-645.
- Hoff, D. A., Bennett, R. E. & Stanley, A. R.** (1947). A sensitive cylinder-plate assay for bacitracin. *Science* **106**, 551-552.
- Horinouchi, S. & Weisblum, B.** (1982). Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *J. Bacteriol.* **150**, 804-814.
- Horinouchi, S. & Weisblum, B.** (1982). Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible resistance to chloramphenicol. *J. Bacteriol.* **150**, 815-825.
- Ikai, Y., Oka, H., Hayakawa, J., Harada, K.-I. & Suzuki, M.** (1992). Structural characterization of bacitracin components by fast atom bombardment (FAB) liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). *J. Antibiotics* **45**, 1325-1334.

- Ishihara, H. & Shimura, K. (1974). Biosynthesis of bacitracin III. Partial purification of a bacitracin-synthesizing enzyme system from *Bacillus licheniformis*. *Biochim. Biophys. Acta* **338**, 588-600.
- Ishihara, H. & Shimura, K. (1988). Further evidence for the presence of a thiazoline ring in the isoleucylcysteine dipeptide intermediate in bacitracin biosynthesis. *FEBS Lett.* **226**, 319-323.
- Itaya, M. & Tanaka, T. (1990). Gene-directed mutagenesis on the chromosome of *Bacillus subtilis* 168. *Mol. Gen. Genet.* **223**, 268-272.
- Johnson, B. A., Anker, H. & Meleney, F. L. (1945). Bacitracin A: A new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science* **102**, 376-377.
- Kameda, K. & Imai, Y. (1985). Isolation and characterization of the multiple charge isoforms of acyl-CoA synthetase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **832**, 343-350.
- Keating, T. A., Marshall, C. G., Walsh, C. T. & Keating, A. E. (2002). The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 522-526.
- Klein, C., Kaletta, C., Schnell, N. & Entian, K. D. (1992). Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 132-142.
- Kohli, R. M., Trauger, J. W., Schwarzer, D., Marahiel, M. A. & Walsh, C. T. (2001). Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry* **40**, 7099-7108.
- Konz, D., Klens, A., Schorgendorfer, K. & Marahiel, M. A. (1997). The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem. Biol.* **4**, 927-937.
- Ku, J., Mirmira, R. G., Liu, L. & Santi, D. V. (1997). Expression of a functional non-ribosomal peptide synthetase module in *Escherichia coli* by co-expression with a phosphopantetheinyl transferase. *Chem. Biol.* **4**, 203-207.
- Kuhlmann, A. U. & Bremer, E. (2002). Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 772-783.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C. & Walsh, C. T. (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* **3**, 923-936.
- Le Grice, S. F. J. (1990). Regulated promotor for high-level expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis*. In *Gene Expression Technology*, pp. 201-214. Edited by D. V. Goeddel. London: Academic Press.
- Lee, S. G. & Lipmann, F. (1975). Tyrocidine synthetase system. *Methods Enzymol.* **43**, 585-602.
- Levy, S. B. (1998). The challenge of antibiotic resistance. *Sci. Am.* **275**, 46-53.

- Li, J., Szittner, R., Derewenda, Z. S. & Meighen, E. A. (1996). Conversion of ser:114 to cyst:114 and the role of the active site nucleophile in acyl transfer by myristoyl-ACP thioesterase from *Vibrio hyrveji*. *Biochemistry* **35**, 9967-9973.
- Linne, U., Doekel, S. & Marahiel, M. A. (2001). Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthesis. *Biochemistry* **40**, 15824-15834.
- Liu, L., Nakano, M. M., Lee, O. H. & Zuber, P. (1996). Plasmid-amplified *comS* enhances genetic competence and suppresses *sinR* in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**, 5144-5152.
- Makinen, K. K. (1972). Inhibition of bacitracin of some hydrolytic enzymes. *Int. J. Pept. Protein. Res.* **4**, 21-28.
- Marahiel, M. A., Nakano, M. M. & Zuber, P. (1993). Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Mol. Microbiol.* **7**, 631-636.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. (1997). Modular peptide synthetases involved in non-ribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97**, 2651-2673.
- May, J. J., Wendrich, T. M. & Marahiel, M. A. (2000). The *dhb* Operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J. Biol. Chem.* **276**, 7209-7217.
- May, J. J., Keßler, N., Marahiel, M. A. & Stubbs, M. T. (2002). Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 12120-12125.
- Menkhaus, M., Ullrich, C., Kluge, B., Vater, J., Vollenbroich, D. & Kamp, R. M. (1993). Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *J. Biol. Chem.* **268**, 7678-7684.
- Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1997). The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J. Bacteriol.* **179**, 6843-6850.
- Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1999). Design and application of multimodular peptide synthetases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 341-348.
- Mootz, H. D., Schwarzer, D. & Marahiel, M. A. (2000). Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 5848-5853.
- Mootz, H. D., Finking, R. & Marahiel, M. A. (2001). 4'-Phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **276**, 37289-37298.
- Mootz, H. D., Schwarzer, D. & Marahiel, M. A. (2002a). Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Bio. Chem.* **3**, 490-504.

- Mootz, H. D., Kessler, N., Linne, U., Eppelmann, K., Schwarzer, D. & Marahiel, M. A.** (2002b). Decreasing the ring-size of a nonribosomal peptide antibiotic by in frame module deletion in the biosynthetic genes. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10980-10981.
- Nakano, M. M., Marahiel, M. A. & Zuber, P.** (1988). Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipoheptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**, 5662-5668.
- Neumüller, A.** (2001). Untersuchungen zur Bacitracin-Selbst-Resistenz in *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 und Grundlagen zur gerichteten Protein-Evolution von Adenylierungs-Domänen aus Peptidsynthetasen. *Dissertation, Fachbereich Chemie, Philipps Universität Marburg*.
- Neumüller, A. M., Konz, D. & Marahiel, M. A.** (2001). The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin "self-resistance" of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3180-3189.
- Neumüller, A. M. & Marahiel, M. A.** (2001). persönliche Mitteilung.
- Ogura, M., Liu, L., LaCelle, M., Nakano, M. M. & Zuber, P.** (1999). Mutational analysis of ComS: evidence for the interaction of ComS and MecA in the regulation of competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Micro.* **32**, 799-812.
- Pavela-Vrancic, M., Pfeifer, E., Schroder, W., von Dohren, H. & Kleinkauf, H.** (1994a). Identification of the ATP binding site in tyrocidine synthetase 1 by selective modification with fluorescein 5'-isothiocyanate. *J. Biol. Chem.* **269**, 14962-14966.
- Pavela-Vrancic, M., Pfeifer, E., van Liempt, H., Schafer, H. J., von Dohren, H. & Kleinkauf, H.** (1994b). ATP binding in peptide synthetases: determination of contact sites of the adenine moiety by photoaffinity labeling of tyrocidine synthetase 1 with 2-azidoadenosine triphosphate. *Biochemistry* **33**, 6276-6283.
- Pazirandeh, M., Chirala, S. S. & Wakil, S. J.** (1991). Site-directed mutagenesis studies on the recombinant thioesterase domain of chicken fatty acid synthase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 20946-20952.
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M. & Wallach, J.** (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 553-563.
- Pfeifer, B. A., Admiraal, S. J., Gramajo, H., Cane, D. E. & Khosla, C.** (2001). Biosynthesis of Complex Polyketides in a Metabolically Engineered Strain of *E. coli*. *Science* **291**, 1790-1792.
- Pfeifer, B. A. & Khosla, C.** (2001). Biosynthesis of Polyketides in Heterologous Hosts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 106-118.
- Podlesek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B., Zgur-Bertok, D., Komel, R. & Grabnar, M.** (1995). *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol. Microbiol.* **16**, 969-976.
- Podlesek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B. & Grabnar, M.** (2000). The role of the bacitracin ABC transporter in bacitracin resistance and collateral detergent sensitivity. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 103-106.

- Quadri, L. E., Weinreb, P. H., Lei, M., Nakano, M. M., Zuber, P. & Walsh, C. T.** (1998). Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* **37**, 1585-1595.
- Razafindralambo, H., Popineau, Y., Deleu, M., Hbid, C., Jacque, P., Thonart, P. & Paquot, M.** (1998). Foaming properties of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*: effect of lipid and peptide structural attributes. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 911-916.
- Reuter, K., Mofid, M. R., Marahiel, M. A. & Ficner, R.** (1999). Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: a prototyp of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *EMBO J.* **18**, 6823-6831.
- Rieber, M. T., Imaeda, T. & Cesari, I. M.** (1969). Bacitracin action on membranes of *Mycobacteria*. *J. Gen. Microbiol.* **55**, 155-159.
- Rieder, H., Heinrich, G., Breuker, E., Simlot, M. M. & Pfaender, P.** (1975). Bacitracin synthetase. *Methods Enzymol.* **43**, 548-559.
- Rodriguez, E. & McDaniel, R.** (2001). Combinatorial biosynthesis of antimicrobials and other natural products. *Curr. Opin. Micro. Biol.* **4**, 526-534.
- Saito, M., Hori, K., Kurotsu, T., Kanda, M. & Saito, Y.** (1995). Three conserved glycine residues in valine activation of gramicidin S synthetase 2 from *Bacillus brevis*. *J. Biochem. (Tokyo)* **117**, 276-282.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edn.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York .
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**, 5463-5467.
- Schauwecker, F., Pfennig, F., Schroder, W. & Keller, U.** (1998). Molecular cloning of the actinomycin synthetase gene cluster from *Streptomyces chrysomallus* and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II. *J. Bacteriol.* **180**, 2468-2474.
- Schauwecker, F., Pfennig, F., Grammel, N. & Keller, U.** (2000). Construction and *in vitro* analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides. *Chem. Biol.* **7**, 287-297.
- Schechter, N., Momose, K. & Rudney, H.** (1972). The effect of bacitracin and Ca²⁺ on the formation of polyprenylphosphates and their incorporation into ubiquinone precursors in mammalian and bacterial systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**, 833-839.
- Schentag J. J., Hyatt, J. M., Carr, J. R., Paladino, J. A., Birmingham, M. C., Zimmer, G. S., & Cumbo T. J.** (1998). Genesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), how treatment of MRSA infections has selected for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, and the importance of antibiotic management and infection control. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 1204-1214.
- Schleifer, K. H., Kloos, W. E. & Moore, A.** (1972). Taxonomic status of *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872, Cohn 1872): correlation between peptidoglycan type and genetic compatibility. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**, 224-227.

- Schmid, I. I., Sattler, I. I., Grabley, S. & Thiericke, R.** (1999). Natural Products in High Throughput Screening: Automated High-Quality Sample Preparation. *J. Biomol. Screen* **4**, 15-25.
- Schneider, A.** (1996). Nichtribosomale Peptidsynthese: Modulaustausch und Funktion der Thioesterase-ähnlichen Proteine. *Dissertation, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, Deutschland*.
- Schneider, A. & Marahiel, M. A.** (1998). Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch. Microbiol.* **169**, 404-410.
- Schneider, A., Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A.** (1998). Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping. *Mol. Gen. Genet.* **257**, 308-318.
- Schwartz, E., Scherrer, G., Hobom, G. & Kössel, H.** (1987). Nucleotide sequence of *cro*, *CII* and part of the *O* gene in phage lambda DNA. *Nature* **272**, 410-414.
- Schwarzer, D. & Marahiel, M. A.** (2001). Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* **88**, 93-101.
- Schwarzer, D., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A.** (2001). Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases. *Chem. Biol.* **8**, 997-1010.
- Schwarzer, D., Mootz, H. D., Linne, U. & Marahiel, M. A.** (2002). Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **in press**.
- Schwecke, T., Aharonowitz, Y., Plissa, H., von Doehren, H., Kleinkauf, H. & van Liempt, H.** (1992). Enzymatic characterization of the multifunktional enzyme delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Streptomyces clavuligerus*. *Eur. J. Biochem.* **205**, 687-694.
- Scutcliffe, J. G.** (1979). Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. *Methods Enzymol.* **43**, 77-90.
- Shaw-Reid, C. A., Kelleher, N. L., Losey, H. C., Gehring, A. M., Berg, C. & Walsh, C. T.** (1999). Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem. Biol.* **6**, 385-400.
- Smith, D. J., Earl, A. J. & Turner, G.** (1990a). The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421,073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. *Embo J.* **9**, 2743-2750.
- Smith, D. J., Burnham, M. K., Edwards, J., Earl, A. J. & Turner, G.** (1990b). Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology (N Y)* **8**, 39-41.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Micro. Biol.* **98**, 503-507.
- Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A.** (1995). Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunktional enzyme GrsA. *J. Biol. Chem.* **270**, 6163-6169.

- Stachelhaus, T., Schneider, A. & Marahiel, M. A.** (1995). Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science* **269**, 69-72.
- Stachelhaus, T., Huser, A. & Marahiel, M. A.** (1996a). Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem. Biol.* **3**, 913-921.
- Stachelhaus, T., Schneider, A. & Marahiel, M. A.** (1996b). Engineered biosynthesis of peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 177-186.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D., Bergendahl, V. & Marahiel, M. A.** (1998). Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 22773-22781.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A.** (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**, 493-505.
- Stachelhaus, T. & Walsh, C. T.** (2000). Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry* **39**, 5775-5787.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A.** (2002). Nonribosomal assembly on peptide antibiotics on modular protein templates. In *Bacillus subtilis and its closest relatives*. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick. Washington DC, USA: ASM Press.
- Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., Mc Dowell, R. & Morris, H. R.** (1994). Detection of 4'-phosphopantetheine at the thioester binding site for L- valine of gramicidinS synthetase 2. *FEBS Lett.* **340**, 39-44.
- Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R. & Morris, H. R.** (1996). The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J. Biol. Chem.* **271**, 15428-15435.
- Steinmetz, M. & Richter, R.** (1984). Plasmids designed to alter the antibiotic resistance expressed by insertion mutations in *Bacillus subtilis*, through *in vivo* recombination. *Gene* **142**, 79-83.
- Steller, S. & Vater, J.** (2000). Purification of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213. *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.* **737**, 267-275.
- Stone, K. J. & Strominger, J. L.** (1971). Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C55-isoprenyl pyrophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **68**, 3223-3227.
- Storm, D. R. & Strominger, J. L.** (1973). Complex formation between bacitracin peptides and isoprenyl pyrophosphates. The specificity of lipid-peptide interactions. *J. Biol. Chem.* **248**, 3940-3945.
- Stryer, L.** (1990). *Biochemie*, dritte Edn. Heidelberg, Berlin, New York: Spektrum Akademischer Verlag.

- Stüber, D., Matile, H. & Garotta, G.** (1990). System for high level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: applications to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. In *Immunological Methods*, pp. 121-152. Edited by I. Levkovits & B. Pernis.
- Symmank, H., Saenger, W. & Bernhard, F.** (1999). Analysis of engineered multifunctional peptide synthetases. Enzymatic characterization of surfactin synthetase domains in hybrid bimodular systems. *J. Biol. Chem.* **274**, 21581-21588.
- Tai, M. H., Chirala, S. S. & Wakil, S. J.** (1993). Roles of Ser101, Asp236, and His237 in catalysis of the thioesterase II ans of the C-terminal region of the enzyme in its interaction with fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**, 1852-1856.
- Toraya, T., Maoka, T., Tsuji, H. & Kobayashi, M.** (1995). Purification and structural determination of an inhibitor of starfish oocyte maturation from *Bacillus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1799-1804.
- Trauger, J. W., Kohli, R. M., Mootz, H. D., Marahiel, M. A. & Walsh, C. T.** (2000). Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* **407**, 215-218.
- Trieu-Cuot, P. & Courvalin, P.** (1983). Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5'-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene* **23**, 331-341.
- Tsuge, K., Ano, T., Hirai, M., Nakamura, Y. & Shoda, M.** (1999). The genes *degQ*, *pps*, and *lpa-8* (*sfp*) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2183-2192.
- Tsuge, K., Ohata, Y. & Shoda, M.** (2001). Gene *yerP*, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3566-3573.
- Tsukagoshi, N., Tamura, G. & Arima, K.** (1970). A novel protoplast-bursting factor (surfactin) obtained from *Bacillus subtilis* IAM 1213. 1. The effects of surfactin on *Bacillus megaterium* KM. *Biochim. Biophys. Acta* **196**, 204-210.
- Turgay, K., Krause, M. & Marahiel, M. A.** (1992). Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol. Microbiol.* **6**, 529-546.
- Turgay, K., Hamoen, L. W., Venema, G. & Dubnau, D.** (1997). Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes and Dev.* **11**, 119-128.
- Vallari, D. S., Jackowski, S. & Rock, C. O.** (1987). Regulation of phosphopantethein kinase by coenzyme A and its thioesters. *J. Biol. Chem.* **262**, 2468-2471.
- Vieira, J. & Messing, J.** (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic primers. *Gene* **19**, 259-268.
- Vollenbroich, D., Özel, M., Vater, J., Kamp, R. M. & Pauli, G.** (1997). Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals* **25**, 289-297.

- Walsh, C. T., Gehring, A. M., Weinreb, P. H., Quadri, L. E. N. & Flugel, R. S.** (1997). Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 309-315.
- Walsh, C.** (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **406**, 775-781.
- Walsh, C. T.** (2002). Combinatorial biosynthesis of antibiotics: challenges and opportunities. *Chem. Bio. Chem.* **3**, 124-134.
- Walton, J. R.** (1981). Modes of action of growth promoting agents. *Fortschr. Veterinaarmed.* **33**, 77-82.
- Weber, G., Schorgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E. & Leitner, E.** (1994). The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr. Genet.* **26**, 120-125.
- Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M. A. & Holak, T. A.** (2000). Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure Fold. Des.* **8**, 407-418.
- Yakimov, M. M., Giuliano, L., Timmis, K. N. & Golyshin, P. N.** (2000). Recombinant acylheptapeptide lichenysin: high level of production by *Bacillus subtilis* cells. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 217-224.
- Zamenhof, P. J. & Villarejo, M.** (1972). Construction and properties of *Escherichia coli* strains exiting alpha-complementation of beta-galactosidase fragments *in vivo*. *J. Bacteriol.* **110**, 171-178
- Zhu, W., Arceneaux, J. E., Beggs, M. L., Byers, B. R., Eisenach, K. D. & Lundrigan, M. D.** (1998). Exochelin genes in *Mycobacterium smegmatis*: identification of an ABC transporter and two non-ribosomal peptide synthetase genes. *Mol. Microbiol.* **29**, 629-639.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel danke ich für das interessante Arbeitsthema, die engagierte Betreuung dieser Arbeit und viele damit verbundene anregende Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Lars O. Essen gilt mein Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises Marahiel und der Nachwuchsgruppen danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, hilfreiche Diskussionen und gute Zusammenarbeit. Denn "Nichts beflügelt die Wissenschaft so, wie der Schwatz mit Kollegen auf dem Flur." (Arno Penzias, Physiker, Nobelpreisträger 1978).

Mein besonderer Dank gebührt hierbei Thomas Dürfahrt, Jürgen May und Dirk Schwarzer für aufbauende Gespräche, sowie Entspannung bei Arbeit und Freizeit. Weiterhin danke ich meinem ehemaligen Betreuer Sascha Dökel, sowie den *in vivo*-Kollegen Andrea Neumüller und Henning Mootz. Thomas Wendrich und Veit Bergendahl gebührt mein Dank für ihre Unterstützung bei der Durchführung der HPLC/MS-Analysen. Für ihre stete Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei Inge Schüler bedanken. Die Organisation des Freezers wurde durch die Hilfe von Rosi Roller-Müller und Gabi Schimpff-Weiland erheblich erleichtert. Des weiteren gilt mein Dank meinen Vertiefungsstudenten, wobei ich Stephan Grünwald und Michael Maue für ihre helfenden Hände bei der Selektivitäts-Veränderung hervorheben möchte.

Für die kritische und schnelle Durchsicht des Manuskriptes möchte ich mich bei Torsten Stachelhaus und Thomas Dürfahrt bedanken.

Besonderer Dank gilt meinem Freund Torsten Stachelhaus, der es durch liebevolle Geduld, Zuspruch und Hilfe verstand, mich auch in schwierigen Zeiten wieder aufzubauen und neu zu motivieren.

Last but not least gilt mein herzlichster Dank meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und auf deren Unterstützung, Hilfe und Verständnis ich mich immer verlassen konnte. Ihnen widme ich diese Arbeit.